

ÜBER DEN EINFLUSS
DES KALLIKREIN-KININ-SYSTEMS
AUF DIE BLUTZUCKERUTILISATION

Experimentell-morphologische Untersuchungen an der Ratte

von
Lieselotte Schack
aus
Offenbach

1979

1980 № 34

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. J. W. Rohen

ÜBER DEN EINFLUSS DES KALLIKREIN-KININ-SYSTEMS AUF DIE BLUTZUCKERUTILISATION

Experimentell-morphologische Untersuchungen an der Ratte

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von

Lieselotte Schack

aus

Offenbach

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. Dr. J.W. Rohen

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.1979

Inhaltsübersicht

	Seite
Einleitung	1
1. Untersuchungen zur Kallikreinwirkung auf die Glukose- utilisation bei diabetischen Ratten (Akutversuche)	7
1.1. Material und Methoden	8
1.1.1. Experimenteller Diabetes	8
1.1.1.1. Pankreatektomie	8
1.1.1.2. Streptozotozin	10
1.1.1.3. Kombination von Pankreatektomie und Streptozotozin	11
1.1.2. Klassifizierung nach Schweregrad des Dia- betes	12
1.1.2.1. Blutzucker	12
1.1.2.2. Glukose-Toleranz-Test (GTT)	13
1.1.2.3. Qualitative Veränderungen der Versuchstiere durch den Diabetes	13
1.1.3. Übersicht über das Untersuchungsgut	14
1.1.4. Versuchsanordnung bei den Akutversuchen (Übersicht)	15
1.1.5. Auswertung der Akutversuche	17
1.1.5.1. K-Wert-Bestimmung	17
1.1.5.2. Statistische Auswertung	18
1.2. Ergebnisse aus den Akutversuchen	19
1.2.1. Wirkung von Kallikrein bei pankreatektomier- ten Ratten auf die Glukoseutilisation nach intraperitonealer Glukosebelastung (Ver- suchsanordnung I a)	19
1.2.1.1. Ergebnisse bei der Kontrollgruppe	20
1.2.1.2. Ergebnisse bei der ersten Pankrea- tektomieserie (P_1)	24
1.2.1.3. Ergebnisse bei der zweiten Pan- kreatektomieserie (P_2)	27
1.2.1.4. Ergebnisse bei schwer diabetischen Tieren (P_3)	30

1.2.2. Wirkung von Kallikrein bei pankreatektomierten Ratten auf die Glukoseutilisation nach oraler Glukosebelastung (Versuchsanordnung I b)	32
1.2.2.1. Ergebnisse bei der Kontrollgruppe	32
1.2.2.2. Ergebnisse bei der ersten Pankreatektomieserie (P_1)	34
1.2.2.3. Ergebnisse aus der zweiten Pankreatektomieserie (P_2)	38
1.2.2.4. Ergebnisse bei schwer diabetischen Tieren (P_3)	42
1.2.3. Wirkung von gleichzeitiger, oraler Kallikrein- und Glukosegabe bei pankreatektomierten Ratten auf die Glukoseutilisation (Versuchsanordnung III, "cocktail"-Versuche)	44
1.2.3.1. Ergebnisse bei der Kontrollgruppe	44
1.2.3.2. Ergebnisse bei der zweiten Pankreatektomieserie (P_2)	47
1.2.4. Ergebnisse des oralen Glukose-Toleranz-Tests bei der zweiten Pankreatektomieserie (P_2)	50
1.2.5. Wirkung von Kallikrein bei streptozotodiatetischen Ratten auf die Glukoseutilisation	52
1.2.5.1. Kallikreineffekt bei der Streptozotozingruppe (S) auf die Glukoseutilisation nach intraperitonealer Glukosebelastung (Versuchsanordnung II)	52
1.2.5.2. Wirkung von Kallikrein bei den Kombinationsratten (P + S) nach intraperitonealer Glukosebelastung (Versuchsanordnung I a)	56
1.2.5.3. Wirkung von Kallikrein bei der Kombinationsgruppe (P + S) nach oraler Glukosebelastung (Versuchsanordnung I b)	59
1.2.6. Intraperitonealer Glukose-Toleranz-Test(i.p. GTT) bei der Streptozotozingruppe und bei der Kombinationsgruppe (P + S)	61

1.3. Diskussion

	Seite
2. Wirkung von Bradykinin auf die Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln (in-vitro-Versuche an der Ratte)	80
2.1. Material und Methode	85
2.1.1. Isolierung der Langerhans'schen Inseln	
2.1.2. Inkubation der isolierten Inseln	88
2.1.3. Insulinbestimmung	90
2.1.4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	90
2.2. Ergebnisse	91
2.2.1. Glukosestimulierte Insulinsekretion isolierter Inseln	
2.2.1.1. Einfluß von 2 ng Bradykinin/ml	94
2.2.1.2. Einfluß von 20 ng Bradykinin/ml	94
2.2.1.3. Einfluß von 200 ng Bradykinin/ml	97
2.2.2. Feinstruktur isolierter Langerhans'scher Inseln	102
2.2.2.1. Morphologie der Inseln nach Isolierung	
2.2.2.2. Befunde nach der Inkubation von Inseln	105
2.3. Diskussion	111
3. Zusammenfassung	115
4. Literaturverzeichnis	118

Obwohl die Kallikreine seit mehr als 50 Jahren bekannt sind, herrscht auch heute noch in vielen Punkten Unklarheit über die physiologische Rolle dieser Enzymgruppe. Dies gilt besonders für das Drüsenkallikrein, das im wesentlichen in den Speicheldrüsen, im Pankreas und in der Niere vorkommt, und entweder exokrin sezerniert wird oder in die Blutbahn abgegeben wird, um dann vom Gefäßsystem aus seine Wirkungen an den jeweiligen Erfolgsorganen zu entfalten.

Man unterscheidet heute im allgemeinen 2 grundsätzlich verschiedene Kallikreine: Zum einen handelt es sich um die höhermolekularen (Molekulargewicht um 80 000) Plasma- oder Serumkallikreine, die durch Aktivierung des Hagemann-Faktors (F XII) sowohl die Gerinnung wie auch durch Plasmaaktivierung die Fibrinolyse in Gang setzen kann. Das Plasmapräkallikrein ist identisch mit dem Fletcher-Faktor. Zum anderen bilden die niedriger molekularen Drüsen-, Gewebs- oder auch Organkallikreine (Molekulargewicht zwischen 16 000 und 39 000, abhängig vom Kohlenhydratanteil) eine Enzymgruppe, in die auch das Harnkallikrein einge-
reicht wird.

Da die Beziehungen dieser beiden Enzymgruppen zueinander recht gering sind (13), soll im folgenden ausschließlich über glanduläres Kallikrein berichtet werden.

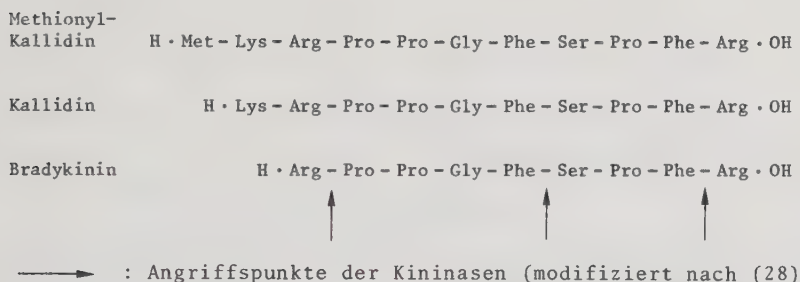
Die Hauptwirkung der Drüsenkallikreine ist die hochspezifisch aus low-molecular-weight Kininogen (LMW-Kininogen, Molekulargewicht etwa 78 000) kurzkettige Peptide abzuspalten, die als

Kinine bezeichnet werden. Kallikreine sind daher als Kininogenasen anzusehen und mit anderen Proteasen vergleichbar. Neben Trypsin zeigt z. B. auch das im Spermakopf vorkommende Acrosin Kininogenasenaktivität, ist jedoch kein Kallikrein (49). Bestimmte Schlangengifte dagegen zeigen so hohe Kininogenaseaktivität, daß sie als Drüsenkallikreine betrachtet werden können. Das Drüsenkallikrein besitzt zahlreiche Wirkungen, die mit der Blutdruckregulation, dem Tonus der glatten Muskulatur (Uterus, Darm, Gefäße), der Zellproliferation und anderen lebenswichtigen Prozessen des Organismus zu tun haben (zusammenfassende Übersichten s. (63), (13), (18), (29), (30), (31), (32)). Die am längsten bekannte Wirkung des Drüsenkallikreins ist die Blutdrucksenkung, die E. K. Frey 1925 durch Injektion von Urin bei Hunden entdeckte, und die noch heute zur biologischen Bestimmung der Enzymaktivität benützt wird (18), (19), (64).

Bei den freigesetzten Kininen handelt es sich vor allem um das Nonapeptid Bradykinin, das Dekapeptid Lysylbradykinin oder Kallidin und das Undekapeptid Methionyl-lysyl-bradykinin oder Methionylkallidin.

Diese Kinine sind in der Lage, im Gewebe die Prostglandinsynthese zu stimulieren (23) und dadurch die verschiedenartigsten Effekte auszulösen. Durch Einwirkung spezifischer Kininasen kann dann die Peptidkette an mehreren Stellen gespalten und damit die Kininwirkung aufgehoben werden (Abb. 1)

Abb. 1:



Besonders wichtig in diesem Zusammenhang erscheint die Kininase II, die nach Erdös (11) mit dem Angiotensin - I - converting - enzyme identisch ist und damit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Nierendurchblutung und der allgemeinen Blutdruckregulation spielt. Obwohl zahlreiche Stellglieder in diesen verschiedenen Regelkreisen heute bereits bekannt sind, ist die zentrale Frage, wie die Kininfreisetzung den Zellstoffwechsel der betreffenden Gewebe verändern kann, jedoch noch nicht gelöst.

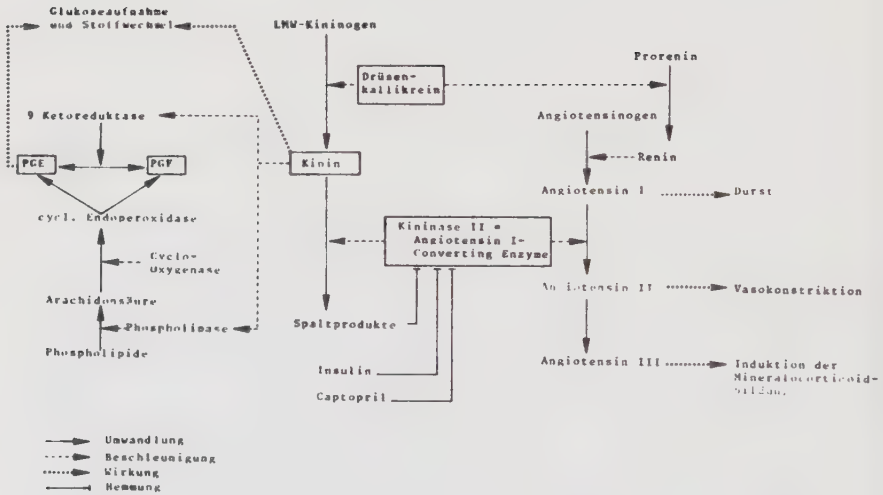


Abb. 2:

Wirkungen des Kallikrein-Kinin-Systems

(modifiziert nach (23), (58), (28))

Schon 1932 hatte E. K. Frey (17) bei pankreatektomierten Hunden durch Injektion von Drüsenkallikrein eine Blutzuckersenkung erzielen können, die nach neueren Befunden von Rohen und Haberland (53) an pankreatektomierten Ratten bestätigt wurde. Diese Beobachtungen legen den Gedanken nahe, daß das Kallikrein-Kinin-System eine wichtige Rolle im Glukosestoffwechsel spielt.

Meng und Haberland (45) gelang bei in-vitro Versuchen am invertierten Rattendünndarm der Nachweis, daß Kallikrein in Dosen von 0,1, 1,0 und 10,0 KE/ml die Mukosa - Serosa Fluxrate für Glukose signifikant zu steigern vermag.

In einer andersartigen Versuchsanordnung konnten Caspary und Creutzfeldt (3) dagegen eine solche Kallikreinwirkung nicht finden. Dagegenüber zeigten Dennhardt und Haberich (5), daß nicht nur der Hexosetransport, sondern auch der Transport von Flüssigkeit und von Lymphe (54) bei der Ratte in vivo durch physiologische Dosen von Kallikrein gefördert wird. Schließlich gelang es Dietze und Mitarbeitern durch Untersuchungen an freiwilligen Probanden zu zeigen, daß Bradykinininfusionen am hypoxischen Muskel (9) die Glukoseextraktion fördert und bei Diabetikern und bei Patienten im postoperativen Streß die gestörte Glukoseverwertung bessert, dagegen bei gesunden Probanden den Blutzucker nicht senkt (65).

Diese Effekte von Bradykinin sind sowohl durch den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor Aprotinin, wie auch durch Blockierung der Prostaglandinsynthese mit Indomethacin hemmbar (10), (66).

Da jedoch die quergestreifte Muskelzelle normalerweise keine Prostaglandine bilden kann, andererseits durch gleichzeitige Insulingaben die Bradykininwirkung verstärkt wird (8), muß man wohl annehmen, daß der durch Insulin/Glukagon-regulierte Glukosestoffwechsel unmittelbar mit dem Kallikrein-Kinin-System gekoppelt ist.

Die vorliegende Arbeit sucht diesem Fragenkomplex von mehreren Seiten aus näher zu kommen.

Zunächst wurde untersucht, ob an pankreatektomierten Versuchstieren, d. h. an prädiabetischen und diabetischen Ratten, durch Kallikreingaben eine Steigerung der Glukoseutilisation bzw. eine Senkung des Blutzuckers erzielt werden kann, wobei die Geschwindigkeit der Glukoseextraktion aus dem Blut nach einer Glukosebelastung als Meßgröße dient (Bestimmung der sog. K-Werte). Im zweiten Teil der Arbeit wird dann die Funktion des Inselapparates des Pankreas in vitro an isolierten Inseln unter dem Einfluß von Bradykinin geprüft, wobei die Insulinsekretion als Parameter dient.

Insgesamt läßt sich aus diesen Versuchen schließen, daß das Kallikrein-Kinin-System mit großer Wahrscheinlichkeit für die glukoseverarbeitende Zelle und damit allgemein für die Bereitstellung von Energie auf zellulärer Ebene von Bedeutung ist.

T E I L I
=====

1. Untersuchungen zur Kallikreinwirkung auf die Glu-
koseutilisation bei diabetischen Ratten (Akutversuche)

1.1. Material und Methoden

Für alle hier beschriebenen Versuche wurden ausschließlich männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem initialen Körpergewicht von mindestens 150 g verwendet. Die Haltung erfolgte paarweise in Makrolonkäfigen mit Trockenfutter (Altromin^R-Standarddiät) und Wasser ad libidum.

1.1.1. Experimenteller Diabetes

Da aus der Literatur bekannt ist, daß Kallikrein akut keinen nachweisbaren Effekt bei Gesunden auf den Blutzuckerspiegel (65) hat, wurde bei den Versuchstieren ein experimenteller Diabetes, also eine Störung der Blutzuckerregulation, einmal durch Ex-tirpation des Pankreas und zum anderen durch chemische Zerstörung der insulinbildenden B-Zellen mit Streptozotolin erzeugt.

1.1.1.1. Pankreatektomie

Bei den mit Barbiturat narkotisierten Tieren (Thiopental bzw. Pentobarbital: 50 mg/kg KG i.p.) wird eine möglichst vollständige Entfernung des Pankreas nach einer modifizierten Methode von Foglia (15) durchgeführt. Nach medianer Incision der Bauchwand wird das Pankreas von den benachbarten Organen (Magen mit Omentum minus und Colon transversum) separiert. Die Milzgefäße werden unterbunden und das Pankreas mit der Milz abgetragen und die Wundränder elektrokoaguliert. Der duodenale und um den Gallengang herum

gelegene Teil der Bauchspeicheldrüse wird unter sorgfältiger Schonung des Gallenganges und derjenigen Gefäße, die den Magen, das Duodenum, das Colon transversum und die Leber versorgen, mit dem Elektroauter abgetragen. Kleine, nahe an der Duodenalwand haftende Pankreasreste werden sowohl von der Ventral- als auch von der Dorsalseite koaguliert (33). Abschließend werden etwa 0,1 g Ampicillin und 2 ml physiologische NaCl-Lösung in die Bauchhöhle instilliert und die Bauchwand in zwei Schichten verschlossen (1. Peritoneum/Muskulatur, 2. Haut). Die Tiere werden postoperativ für 2 Tage einzeln gehalten und erhalten erst nach 24 Stunden wieder Wasser. Weitere 24 Stunden später bekommen sie dann auch wieder Futter.

Mit einiger Übung kann diese Operation in etwa 10 Minuten ausgeführt werden. Die Mortalität liegt in der Regel unter 10 %. Die postoperative Erholungsphase wurde auf mindestens 7 Tage festgelegt. Für die folgenden Versuche wurden in der Regel Tiere verwendet, bei denen die Pankreatektomie nur 2 oder 3 Wochen zurücklag.

1.1.1.2. Streptozotozin

Streptozotozin (Lot U-9889, 2 x 1000 mg, freundlicherweise von Upjohn zur Verfügung gestellt) ist ein Glucosyl-Nitroso-Harnstoff mit selektiver, dosisabhängiger B-Zellentoxizität (55). In dieser Studie wurde Streptozotozin in einer Dosis von insgesamt 100 mg/kg KG in Citratpuffer nach Sørensen (pH 4,5) gelöst intraperitoneal an 2 aufeinander folgenden Tagen appliziert. Bei allen so behandelten Ratten trat bereits 2 Tage nach der Injektion ein Blutzuckeranstieg von im Mittel auf 360 mg/100 ml ein. Die insgesamt 14 so behandelten Tiere zeigten eine rasch zunehmende Verschlechterung des Allgemeinzustandes, keine Gewichtszunahme, struppiges Fell sowie eine massive Polydipsie und Polyurie. Die Mortalität war hoch und betrug ohne Insulinsubstitution nach

2 Tagen	0 %	(n = 14)
2 Wochen	50 %	(n = 7)
4 Wochen	57 %	(n = 8).

1.1.1.3. Kombination von Pankreatektomie und Streptozotozin

Ratten, die etwa ein halbes Jahr zuvor pankreatektomiert worden waren, jedoch keine schwere Störung des Glukosestoffwechsels aufwiesen, erhielten Streptozotozin in einer niedrigeren Dosis. An 2 aufeinanderfolgenden Tagen wurden, unabhängig vom Körpergewicht, je 5 mg intraperitoneal gespritzt. Nur bei 8 von 19 dieser pankreatektomierten Ratten trat die erwartete Verschlechterung des Diabetes mellitus ein.

1.1.2. Klassifizierung nach Schweregrad des Diabetes mellitus

1.1.2.1. Blutzucker

Zur Bestimmung des Blutzuckers wurde bei allen Tieren Blut aus der Schwanzvene in Äthernarkose entnommen, zur Enteiweißung in 0,33 n Trichlor-essigsäure pipettiert und mit einer Hexokinase-methode bestimmt ¹.

War der Blutzucker morgens zwischen 7⁰⁰ und 9⁰⁰ unter 200 mg/ 100 ml wurden die Tiere als leicht diabetisch, bei über 200 mg/ 100 ml als schwer diabetisch bezeichnet. Die Eingruppierung der Versuchstiere nach diesen Blutzuckerwerten erfolgte bei den beiden Pankreatektomieserien (P₁, P₂) eine bis zwei Wochen nach der Operation, bei den mit Streptozotozin behandelten Tieren (S) und bei der Kombinationsserie (P+S - Serie) zwei bis vier Tage nach der Injektion von Streptozotozin.

1. Die Blutzuckerbestimmungen wurden vom Zentral-labor der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt.

1.1.2.2. Glukose-Toleranz-Test (GTT)

Bei einigen Versuchsgruppen wurde vor dem eigentlichen Versuchsbeginn eine orale oder intraperitoneale Glukosebelastung durchgeführt. Dabei wurden 0,5 g Glukose in 2 ml Wasser gelöst über eine Sonde in den Magen gegeben oder intraperitoneal injiziert und zu verschiedenen Zeiten bis zu 4 Stunden nach der Glukosegabe der Blutzucker bestimmt.

1.1.2.3. Qualitative Veränderungen der Versuchstiere durch den Diabetes mellitus

Bei allen Tieren wurde vor jedem Eingriff oder zu Beginn eines Versuches das Körpergewicht bestimmt, d. h. ein bis zwei mal wöchentlich. Der Gewichtszuwachs war bei den schwer diabetischen Ratten erheblich geringer, in einigen Fällen sogar aufgehoben, als bei den leicht diabetischen. Die Polyurie und Polydipsie, wie auch die Ketonkörperausscheidung im Harn wurden nicht quantifiziert.

1.1.3. Übersicht über das Untersuchungsgut

- a) Kontrollgruppe: 10 gesunde Sprague-Dawley-Ratten;
mittleres Körpergewicht: 310 g

b) Pankreatektomiegruppe (P)

P₁, 1. Serie: n = 14 (Nr. 164-177); mittleres Kör-
gewicht: 185 g
(Operation vom 24.-28.10.1977)

P₂, 2. Serie: n = 21 (Nr. 178-198); mittleres Körper-
gewicht: 290 g
(Operation vom 21.-23.8.1978)

Bei beiden Serien wurde keine Unterschei-
dung nach Schweregrad des Diabetes vor-
genommen.

Gruppe Pankreatektomie 76/77, P₃

n = 6; mittleres Körpergewicht: 320 g.

Alle Tiere schwer diabetisch.

c) Streptozotozingruppe (S)

n = 14 (151-164); mittleres Körpergewicht: 180 g

Alle Tiere schwer diabetisch.

d) Pankreatektomie- und Streptozotozingruppe (P + S)

n = 18 (77-146); Streptozotozin: 6-7 Monate nach
der Operation; Untergruppierung nach morgendlichem
Blutzucker und Glukosetoleranztest in

- leicht diabetische Tiere: n = 10;
mittleres Körpergewicht: 457 g und

- schwer diabetische Tiere: n = 8;
mittleres Körpergewicht: 422 g.

1.1.4. Versuchsanordnung bei den Akutversuchen

Die Versuche selbst werden im Ergebnisteil genauer beschrieben. Hier soll nur eine Übersicht über die einzelnen Versuchsanordnungen gegeben werden. In diesen sog. Akutversuchen wurde als Testsubstanz ausschließlich hochgereinigtes, lyophilisiertes Schweinepankreas-kallikrein mit einer Aktivität von 1180 KE/mg verwendet (freundlicherweise von Bayer, Leverkusen, zur Verfügung gestellt) und unmittelbar vor Gebrauch in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Bei intraperitonealer Applikation wurde das Kallikrein in einer Dosierung von 1000 KE/kg Körpergewicht verabreicht und bei oraler Gabe um den Faktor 10 höher dosiert, d. h. 10.000 KE/kg KG. Den Tieren wurde 16 bis 18 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen.

Bei der Versuchsanordnung Ia, die an einem Kollektiv von 62 Ratten durchgeführt wurde, wurde Kallikrein intraperitoneal appliziert, und zwar eine bzw. zwei Stunden vor einer ebenfalls intraperitonealen Injektion von 0,5 g Glukose. Der Blutzuckerspiegel wurde dann in bestimmten zeitlichen Abständen bis zur 4. Stunde nach der Glukoseinjektion bestimmt.

Bei der Versuchsanordnung Ib wurde im Gegensatz zu Ia die Glukose oral appliziert, sonst aber die Versuchsanordnung von Ia in der Regel nicht geändert.

Bei den mit II bezeichneten Versuchen wurde die Glukosetoleranz bei den diabetischen Ratten unter dem Einfluß von Kallikrein getestet, und zwar wurde in der Versuchsgruppe IIa zwei Stunden vor der Kallikreinapplikation Glukose intraperitoneal appliziert.

Bei der mit III bezeichneten Versuchsgruppe (sog. "cocktail-Versuch") erhielten die Tiere mittels einer Magensonde Kallikrein- bzw. NaCl-Lösung gleichzeitig mit der Glukose. Auch hier wurde der zeitliche Verlauf des Blutzuckers bestimmt.

Für die Glukosetoleranzteste (GTT) wurden sowohl die Streptozotozin- als auch die Pankreatektomieratten verwendet. In der Regel wurde dabei die Glukose intraperitoneal, nur bei der zweiten Pankreatektomieserie oral appliziert.

In allen Versuchen wurde der Blutzucker zu definierten Zeiten nach der Glukosegabe bestimmt, wobei jedoch die Zeitpunkte für die einzelnen Versuchsgruppen so variiert wurden, daß aus dem Kurvenverlauf der K-Wert berechnet werden konnte.

1.1.5. Auswertung der Akutversuche

1.1.5.1. K-Wert Bestimmung

Für jedes Tier und jede Versuchsanordnung wurden die Blutglukosekonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit auf semilogarithmisches Papier aufgetragen. Die logarithmisch geteilte Ordinate entspricht dabei den Glukosekonzentrationen in mg/100 ml und die lineare Abszisse der Zeit in Minuten. Der Teil der Blutzuckerkurve, der linear nach der Glukosebelastung abfällt, wird als repräsentative Gerade direkt gezeichnet. Der K-Wert wird nach der folgenden Formel errechnet:

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{t_2 - t_1} \cdot \ln 10,$$

wobei

C_1 = die Glukosekonzentration zu Beginn der Geraden

t_1 = der Zeitpunkt, zu dem C_1 gemessen wurde,

C_2 = 100 mg/100 ml Blutzucker,

t_2 = Zeitpunkt, zu dem die Verlängerung der repräsentativen Geraden der Blutzuckerkonzentration von C_2 entspricht.

$\ln 10$ = natürlicher Logarithmus von 10

$\left. \begin{array}{l} \log C_1 \\ \log C_2 \end{array} \right\} = \text{dekadischer Logarithmus von } C_1 \text{ bzw. } C_2$

Lag der Schnittpunkt der repräsentativen Geraden mit der Blutzuckerkonzentration von 100 mg/ 100 ml nicht mehr auf dem Papier, wurde für C_2 der tiefste auf der Geraden liegende Meßwert und für t_2 der zugehörige Zeitpunkt eingesetzt.

K-Werte wurden nicht bestimmt oder konnten nicht bestimmt werden, wenn die Blutzuckerkurve insgesamt mehr linear, nur ansteigend oder wellenförmig verlief, also keine deutliche Mittelphase erkennbar war (4).

1.1.5.2. Statistische Auswertung

Für alle Versuchsanordnungen und -gruppen wurde aus den K-Werten das arithmetische Mittel ($\bar{K}$) und die Standardabweichung (s) der mit (K_{Kall}) und ohne (K_{NaCl}) Kallikrein behandelten Tiere berechnet. Für jedes Tier wurde die Differenz zwischen dem K-Wert mit und ohne Kallikrein ($K_{Kall} - K_{NaCl} = \Delta K$) gebildet und auch hier der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (s) bestimmt. Soweit es die Fallzahl zuließ, wurde der Wilcoxon - Test für verbundene Stichproben durchgeführt und die Wahrscheinlichkeit (p) tabellarisch ermittelt (56).

1.2. Ergebnisse der Akutversuche

i.2.1. Wirkung von Kallikrein bei pankreatektomierten Ratten auf die Glukoseutilisation nach i.p. Glukosebelastung (Versuchsanordnung Ia)

Bei allen Tieren ($n = 40$) wurde vor Beginn des Versuches das Körpergewicht und der Blutzucker bestimmt. Das jeweilige Versuchskollektiv wurde dann zufällig in zwei gleiche Gruppen geteilt, von denen die eine eine Kallikreinlösung, die andere eine physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert erhielt. Eine bzw. zwei Stunden nach dieser Injektion erhielten alle Tiere 2 ml einer 25 %igen Glukoselösung, d. h. 0,5 g Glukose intraperitoneal. Der Blutzucker wurde dann 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 und 240 Minuten danach bestimmt. Nach einer 5 bis 7-tätigen Erholungsphase wurden die Versuchsgruppen gegeneinander vertauscht und der Versuch dann in derselben Form wiederholt.

Bei den Versuchen der Gruppe Ib wurde im wesentlichen dieselbe Anordnung beibehalten. Es erfolgte lediglich die Applikation von Glukose mittels einer Magensonde, d.h. oral.

1.2.1.1. Ergebnisse bei der Kontrollgruppe

Als Kontrollen dienten nicht-pankreatektomierte, gesunde, männliche Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 310 g (10 Tiere). Zweimal vor der i.p. Injektion von 1000 KE/kg KG Kallikrein, und dann eine Stunde nach der Injektion wurde der Blutzucker bestimmt. Sofort anschließend, d. h. 60 Minuten nach der Kallikrein- bzw. NaCl-Injektion erfolgte dann eine i.p. Injektion von 0,5 g Glukose mit nachfolgenden Blutzuckerbestimmungen, und zwar nach 5, 10, 15, 20, 30, 40 und 60 Minuten.

Abbildung 3 zeigt am Beispiel von Tier 209 eine typische Blutzuckerkurve mit und ohne Kallikrein: der morgendliche Blutzuckerwert von 120 bis 130 mg/100 ml fällt nach einer Stunde mit und ohne Kallikrein i.p. geringfügig auf 100 bis 120 mg/100 ml ab. Nach der Glukoseinjektion kommt es während der folgenden 15 bis 20 Minuten zu einem Blutzuckeranstieg auf 180 bis 200 mg/100 ml, der unter kallikrein etwas höher ist und anschließend bis zur 30. Minute einen etwas steileren Abfall zeigt als bei den NaCl-injizierten Tieren.

Eine Stunde nach der Glukosegabe ist der Ausgangswert noch nicht ganz wieder erreicht.

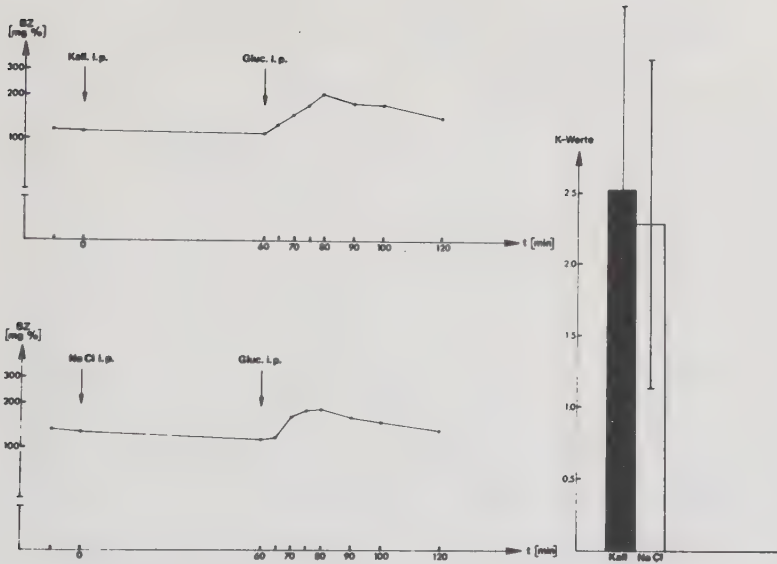


Abb. 3: links: Typische Blutzuckerkurve einer Kontrollratte bei intraperitonealer Vorbehandlung mit Kallikrein und nachfolgender i.p. Glukosebelastung (Versuchsanordnung Ia)
rechts: Mittlere K-Werte der Kontrollgruppe mit und ohne Kallikrein

Der durchschnittliche K-Wert beträgt in der Kallikreingruppe 2,47 und in der NaCl-Gruppe 2,24. Die Einzelwerte der Kontrollgruppe sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Die Differenz der K-Werte beträgt im Mittel 0,33, ist jedoch nicht signifikant.

Tab. 1:

K-Werte der Kontrollgruppe aus der Versuchsanordnung I a
(Kallikrein/NaCl i.p., 1 Stunde nachfolgend i.p. Glukose-
belastung)

Tier-Nr.	K _{Kall}	K _{NaCl}	ΔK
200	4,38	3,28	1,10
201	2,20	1,51	0,69
202	1,10	0,81	0,29
203	2,85	4,63	- 1,78
204	1,66	Ø	Ø
205	1,37	2,27	- 0,90
206	Ø	2,18	Ø
207	4,61	2,11	2,50
208	2,44	1,94	0,50
209	1,65	1,43	0,22
Mittel	2,47	2,24	0,33
s	$\pm$ 1,27	$\pm$ 1,13	$\pm$ 1,20
p			n.s.

1.2.1.2. Ergebnisse bei der ersten Pankreatektomieserie (P₁)

Bei dieser Versuchsanordnung (Ia) erhielten die Tiere der ersten Pankreatektomieserie (n = 12) 14 bis 18 Tage nach der Operation 2 Stunden vor der i.p. Glukoseinjektion (0,5 g/2 ml) eine i.p. Injektion von 1000 KE/kg KG Kallikrein bzw. ein entsprechendes Volumen physiologischer Kochsalzlösung. Der Blutzucker wurde in dieser Gruppe dann in Abständen von 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 und 240 Minuten bestimmt.

Den Verlauf einer typischen Blutzuckerkurve zeigt Abbildung 4. Während die Blutzuckerkonzentration anfangs, also nach der i.p. Injektion von Kallikrein bzw. NaCl annähernd konstant bleibt, kommt es nach der Glukosegabe zu einem steilen Anstieg und anschließend zu einem langsamen Abfall des Blutzuckerspiegels. Im Gegensatz zu der NaCl-Kontrolle zeigt das Tier bei Kallikreingabe jedoch einen rascheren Abfall des Blutzuckers zur Norm in der Mittelphase und einen steileren Anstieg der Blutzuckerwerte in der Initialphase.

Die Berechnung der K-Werte in dieser Gruppe (P₁) zeigt (vgl. Tab. 2), daß diese Unterschiede hochsignifikant ($p \leq 0,1 \%$) sind.

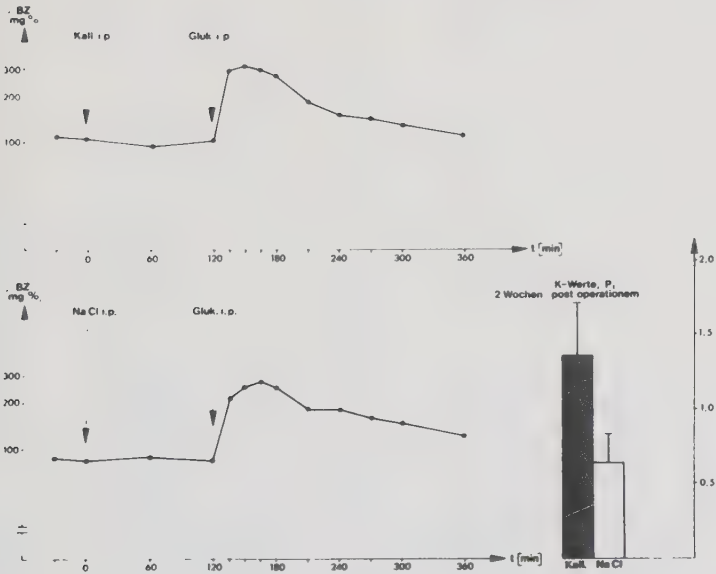


Abb. 4: links: Typische Blutzuckerkurve einer Ratte aus der ersten Pankreatektomieserie bei intra-peritonealer Kallikreinvorbehandlung und nach 2 Stunden folgender intraperitonealer Glukosebelastung (Versuchsanordnung I a)

rechts: Mittlere K-Werte der ersten Pankreatektomieserie (P₁) aus Versuchsanordnung I a mit und ohne Kallikrein

Tab. 2:

K-Werte der ersten Pankreatektomieserie (P_1) aus der Versuchsanordnung I a (Kallikrein/NaCl i.p., 2 Stunden nachfolgend i.p. Glukosebelastung)

Tier-Nr.	K_{Kall}	K_{NaCl}	ΔK
164	1,32	1,0	0,32
167	1,81	0,33	1,48
168	1,52	0,72	0,80
169	1,28	0,82	0,46
170	1,02	0,69	0,33
171	1,54	0,71	0,83
172	1,65	0,66	0,69
173	1,46	0,35	1,11
174	0,50	0,57	- 0,07
175	1,20	0,59	0,61
176	1,39	0,34	1,05
177	1,08	0,64	0,44
Mittel	<u>1,31</u>	<u>0,62</u>	<u>0,69</u>
s	$\pm$ 0,34	$\pm$ 0,19	$\pm$ 0,43
p			$\approx$ 0,1 %

Die Versuche wurden 14 bis 18 Tage post operationem durchgeführt.

1.2.1.3. Ergebnisse bei der zweiten Pankreatektomieserie (P₂)

In dieser Gruppe wurde dieselbe Versuchsanordnung wie bei der vorigen P₁-Gruppe (Ia) gewählt, nur wurde die Kallikreininjektion statt 2 Stunden jetzt nur eine Stunde vor der Glukosebelastung gegeben. Auch erfolgte die Versuchsdurchführung erst 33 bis 39 Tage nach der Operation. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 330 g. Nach der Operation sind 2 Ratten gestorben. Bei weiteren zweien konnten wegen der atypisch verlaufenden Belastungskurven keine K-Werte errechnet werden, so daß für die statistische Auswertung nur 17 Fälle zur Verfügung standen.

Abbildung 5 zeigt exemplarisch für diese Gruppe die Blutzuckerkurve von Tier 197, in der prinzipiell der gleiche Verlauf zu erkennen ist wie in der vorangegangenen Serie (P₁). Die Unterschiede zwischen der Kallikrein- und der NaCl-Gruppe sind jedoch nicht mehr ganz so deutlich, wenn auch noch signifikant ($p = 1 \%$). Auch bei dieser Versuchsanordnung (Ia) und Gruppe (P₂) liegt der mittlere K-Wert der kallikreinbehandelten Tiere wesentlich höher als der der NaCl-Kontrollen, und zwar 1,36 gegenüber 0,88, was einer durchschnittlichen Differenz von 0,48 entspricht (vgl. Tab. 3).

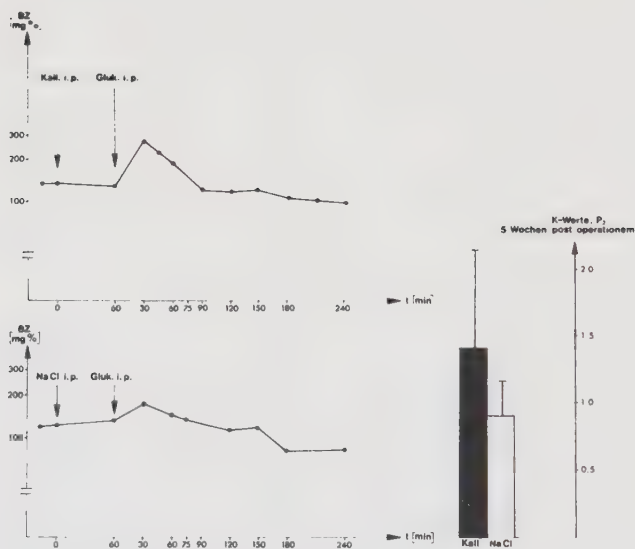


Abb. 5: links: Typische Blutzuckerkurve einer Ratte aus der zweiten Pankreatektomieserie (P₂) bei intra-peritonealer Glukosebelastung eine Stunde einer intraperitonealen Kallikreingabe folgend (Versuchsanordnung I a)

rechts: Mittlere K-Werte der zweiten Pankreatektomie-serie (P₂) bei Versuchsanordnung I a

Tab. 3:

K-Werte der zweiten Pankreatektomieserie (P₂) aus der Versuchsanordnung I a (Kallikrein/NaCl i.p., 1 Stunde nachfolgend i.p. Glukosebelastung)

Tier-Nr.	K _{Kall}	K _{NaCl}	ΔK
178	0,59	0,55	0,04
179	2,22	0,64	1,58
180	1,38	0,89	0,49
181	3,53	0,93	2,6
182	1,82	1,27	0,55
183	1,15	1,08	0,07
184	1,09	1,39	- 0,3
185	1,23	∅	∅
186	0,92	0,66	0,26
187	0,52	1,15	- 0,63
188	1,00	0,79	0,21
189	(⊕)	∅	∅
190	1,66	1,38	0,28
191	1,75	0,98	0,77
192	0,79	0,43	0,36
193	0,91	0,72	0,19
194	∅	∅	∅
195	1,14	0,64	0,50
196	(⊕)	∅	∅
197	1,44	0,38	1,06
198	0,96	1,02	- 0,06
Mittel	1,36	0,88	0,48
s	± 0,7	± 0,25	± 0,73
p			≤ 1 %

1.2.1.4. Ergebnisse bei den schwer diabetischen Tieren (P_3)

Diese Versuchsgruppe besteht aus nur fünf Tieren mit einem schweren Diabetes mellitus, der etwa ein Jahr zuvor durch Pankreatektomie erzeugt wurde und nicht mit Insulin behandelt wurde. Die Tiere wurden etwa ein Jahr nach der Operation der Versuchsanordnung Ia unterworfen, d. h. die Versuchstiere erhielten 2 Stunden vor der intraperitonealen Glukosebelastung Kallikrein bzw. NaCl intraperitoneal, und der Blutzucker wurde 15, 30, 45, 90, 120, 150, 180 und 240 Minuten nach der Glukosegabe bestimmt. 11 Tage danach wurde der gleiche Versuch noch einmal durchgeführt, wobei das Kallikrein- und das NaCl-Kollektiv vertauscht wurde.

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die K-Werte und K-Wert-Differenz in dieser Gruppe. Zwischen den K-Werten der NaCl-Kontrollen und der Kallikrein-behandelten Tiere zeigt sich kein nennenswerter Unterschied.

Tab. 4:

K-Werte der schwer diabetischen Tiere (P_3) aus der Versuchsanordnung I a (Kallikrein/NaCl i.p., 2 Stunden nachfolgend einer i.p. Glukosebelastung)

Tier-Nr.	K_{Kall}	K_{NaCl}	ΔK
818	0,28	0,31	- 0,03
95	0,23	0,20	0,03
99	0,40	0,52	- 0,12
142	0,62	0,31	0,31
56	0,25	Ø	Ø
Mittel	0,36	0,34	0,05
s	$\pm 0,2$	$\pm 0,13$	$\pm 0,19$

1.2.2. Wirkung von Kallikrein bei pankreatektomierten Ratten
auf die Glukoseutilisation nach oraler Glukosebe-
lastung (Versuchsanordnung Ib)

1.2.2.1. Ergebnisse aus der Kontrollgruppe

Diese Versuche wurden in ähnlicher Weise durch-
geführt, wie die der vorangegangenen Gruppen. Von
10 gesunden, nicht pankreatektomierten, männlichen
Ratten, die in den Versuch genommen wurden, konnten
nur 7 ausgewertet werden. Alle Tiere erhielten
eine Stunde vor der Glukosegabe 1000 KE/kg KG
Kallikrein intraperitoneal. Die Glukose (0,5 g/
2 ml) wurde mittels einer Magensonde appliziert.
Der Blutzucker wurde wiederum in zeitlichen Ab-
ständen von 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 und 80
Minuten bestimmt.

Es zeigte sich, daß bei diesen Normaltieren die
Blutzuckerkurve wesentlich flacher verläuft als
bei den pankreatektomierten Tieren. Nach oraler
Glukosegabe ist ein geringerer Blutzuckeranstieg
zu verzeichnen, als nach intraperitonealer Appli-
kation. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, beträgt
der mittlere K-Wert in dieser Gruppe mit Kalli-
krein $2,02 \pm 0,48$, ohne Kallikrein $1,85 \pm 0,66$
und die mittlere Differenz $0 \pm 0,57$.

Tab. 5:

K-Werte der Kontrollgruppe aus der Versuchsanordnung I b
(Kallikrein/NaCl i.p., 1 Stunde danach orale Glukosebelastung)

Tier-Nr.	K _{Kall}	K _{NaCl}	ΔK
200	2,18	2,92	- 0,74
201	1,91	2,60	- 0,64
202	1,94	1,46	0,48
203	1,65	2,07	- 0,42
204	2,46	1,89	0,57
205	∅	1,79	∅
206	(⊕)	0,95	∅
207	2,70	2,32	0,38
208	∅	1,53	∅
209	1,30	0,93	0,37
Mittel	2,02	1,85	0
s	± 0,48	± 0,66	± 0,57

1.2.2.2. Ergebnisse bei der ersten Pankreatektomieserie (P₁)

Die 12 Ratten der ersten Pankreatektomieserie (P₁), die bereits oben beschrieben worden sind, wurden 25 bis 31 Tage nach der Pankreatektomie oral mit 0,5 g/2 ml Glukose belastet. Nach der Glukosegabe wurde der Blutzucker in zeitlichen Abständen von 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 Minuten bestimmt. Die Kallikreingabe erfolgte wieder 2 Stunden vor der Glukosebelastung, und zwar bei der einen Hälfte der Tiere intraperitoneal, bei der anderen oral, jeweils in einer Dosierung von 1000 KE/kg KG.

Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind aus der Tabelle 6 ersichtlich. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen zwei typische Belastungskurven: Bei Tier 169 wurde Kallikrein in einer Dosis von 1000 KE/kg KG intraperitoneal (Abb. 7) und bei Tier 168 Kallikrein in gleicher Dosierung oral (Abb. 6) verabreicht. Die K-Werte zeigen bei beiden Serien keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Kallikrein-behandelten und den NaCl-Kontrolltieren (s. Tab. 6).

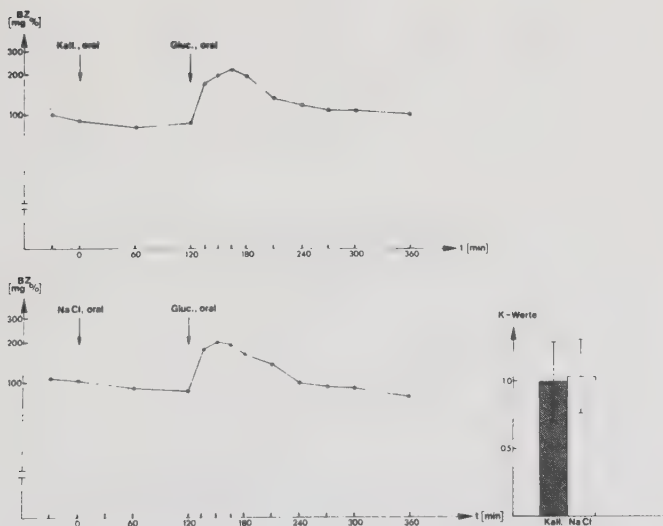


Abb. 6: links: Typische Blutzuckerkurve einer Ratte aus der ersten Pankreatektomieserie (P_1) bei oraler Kallikrein/ NaCl -Vorbehandlung und oraler Glukosebelastung (Versuchsanordnung I b)

rechts: Mittlere K-Werte der ersten Pankreatektomieserie (P_1) bei der Versuchsanordnung I b

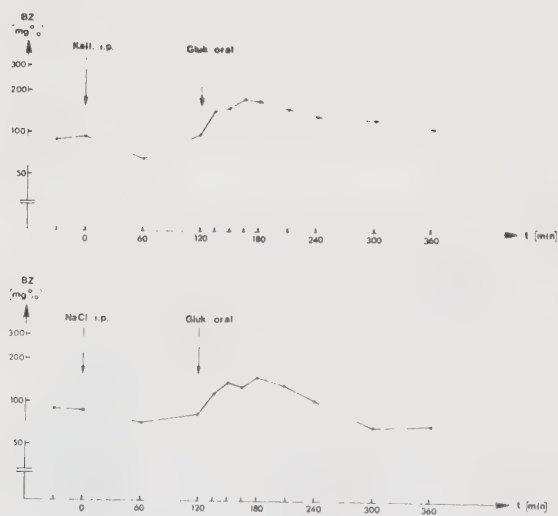


Abb. 7:

Typische Blutzuckerkurve einer Ratte aus der ersten Pankreatektomie-Serie (P_1) bei intraperitonealer Kallikrein/ NaCl -Vorbehandlung und oraler Glukosebelastung

Tab. 6:

K-Werte der ersten Pankreatektomieserie (P_1) aus der Versuchsanordnung I b (orale Glukoseapplikation 2 Stunden nach Kallikrein/NaCl-Vorbehandlung)

Tier-Nr.	K_{Kall}	K_{NaCl}	ΔK
164*	1,22	1,17	0,05
167	0,67	1,35	- 0,68
168*	1,34	1,04	0,30
169	0,45	0,90	- 0,45
170*	1,04	0,91	0,13
171	1,42	0,70	0,72
172*	0,72	0,97	- 0,25
173	0,76	1,35	- 0,59
174*	0,86	0,86	0
175	1,10	1,17	- 0,07
176*	1,18	1,14	0,04
177	1,22	0,91	0,3
Mittel	<u>1,0</u>	<u>1,04</u>	<u>- 0,04</u>
s	$\pm 0,3$	$\pm 0,28$	$\pm 0,41$
p			n.s.

* : Die Tiere, die mit einem * versehen sind, erhielten 1000 KE Kallikrein/kg KG oral.

1.2.2.3. Ergebnisse bei der zweiten Pankreatektomieserie (P_2)

In dieser Versuchsreihe, die an den 21 Tieren der zweiten Pankreatektomieserie durchgeführt wurde, erfolgte im Gegensatz zur Kontrollgruppe und der ersten Pankreatektomieserie nicht nur die Glukosegabe oral, sondern auch die Kallikrein- bzw. NaCl-Gabe oral. Kallikrein wurde in einer Dosierung von 10000 KE/kg KG, d.h. in einer 10-fach höheren als im vorangegangenen Versuch, verabreicht. Die Kallikrein- bzw. NaCl-Applikation erfolgte jedoch nicht wie in der ersten Pankreatektomieserie 2 Stunden, sondern nur eine Stunde vor der Glukosegabe. Die Untersuchung lief etwa im gleichen postoperativen Zeitraum wie bei der ersten Pankreatektomieserie, nämlich vom 27. bis 32. postoperativen Tag. Bei 3 Versuchstieren konnte weder ein K-Wert unter Kallikreineinwirkung noch ein Kontroll-K-Wert, bei weiteren 3 kein Kontroll- und 2 weiteren kein Kallikrein-K-Wert bestimmt werden, so daß nur 13 Tiere für die Differenzbewertung übrig blieben.

Tabelle 7 gibt die K-Werte dieser Gruppe (P_2) mit und ohne Kallikrein, die K-Wert-Differenz und die Mittelwerte mit Standardabweichung wieder.

Tab. 7:

K-Werte der zweiten Pankreatektomieserie (P₂) aus der Versuchsanordnung I b (orale Glukoseapplikation 1 Stunde nach oraler Kallikrein/NaCl-Vorbehandlung)

Tier-Nr.	K _{Kall}	K _{NaCl}	Δ K
178	0,55	0,33	0,22
179	Ø	Ø	Ø
180	0,75	0,16	0,59
181	Ø	0,13	Ø
182	0,81	0,29	0,52
183	Ø	Ø	Ø
184	0,63	0,94	- 0,31
185	0,58	0,52	0,06
186	0,63	0,33	0,3
187	Ø	Ø	Ø
188	0,60	Ø	Ø
189	0,51	0,44	0,07
190	0,62	0,52	0,08
191	0,36	Ø	Ø
192	0,73	0,36	0,37
193	0,60	Ø	Ø
194	Ø	0,64	Ø
195	0,92	0,76	0,16
196	0,98	0,38	0,60
197	0,79	0,52	0,27
198	0,69	0,79	- 0,1
Mittel	0,67	0,47	0,29
s	± 0,15	± 0,23	± 0,28
p			≤ 0,05

Wie die Befunde zeigen, liegt hier der mittlere K-Wert der Kallikrein-behandelten Tiere wieder über dem der Kontrolltiere (Abb. 8). Die Unterschiede sind statistisch noch signifikant ($p \leq 5\%$). Insgesamt sind jedoch die K-Werte recht niedrig, was darauf hinweist, daß sich bei dieser Gruppe bereits ein manifester Diabetes mellitus entwickelt hat.

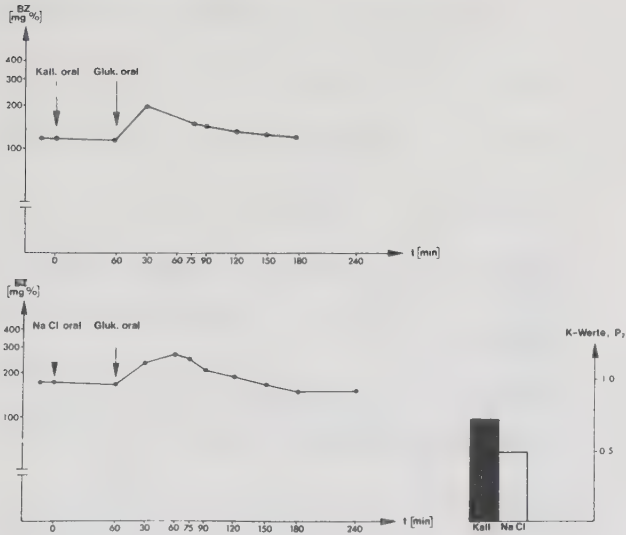


Abb. 8: links: Typische Blutzuckerkurve einer Ratte aus der zweiten Pankreatektomieserie (P_2) bei oraler Vorbehandlung mit Kallikrein und nachfolgender oraler Glukosebelastung (Versuchsanordnung I b)

rechts: Mittlere K-Werte der zweiten Pankreatektomieserie (P_2) bei Versuchsanordnung I b

1.2.2.4. Ergebnisse bei schwer diabetischen Tieren (P₃)

Alle Tiere dieser Gruppe sind vor einem-bis ein-einhalb Jahren pankreatektomiert worden und schwer diabetisch. Sie wurden nie mit Insulin behandelt. Der größte Teil dieser Tiere ist frühzeitig gestorben. Trotz der geringen Zahl der übriggebliebenen Versuchstiere wurde eine orale Glukosebelastung mit und ohne Kallikrein durchgeführt, allerdings ohne die schwerkranken Tiere eine Woche später noch einmal zu belasten. Das mittlere Körpergewicht dieser Tiere betrug nur 290 g, während sonst Ratten dieses Alters ein Gewicht von etwa 500 g erreicht haben. Kallikrein in einer Dosierung von 1000 KE/kg KG zeigte bei intraperitonealer Applikation keinen Effekt auf die K-Werte nach oraler Glukosebelastung.

Tabelle 8 zeigt die K-Werte dieser 5 Tiere, die insgesamt sehr niedrig sind.

Tab. 8:

K-Werte der schwer diabetischen Tiere (P_3) bei der Versuchsanordnung I b (orale Glukoseapplikation 2 Stunden nach Kallikrein/NaCl-Vorbehandlung)

Tier-Nr.	K_{Kall}	K_{NaCl}
818	0,39	
99	0,70	
56	0,34	
95		0,58
142		0,33
Mittel	0,48	0,46
s	$\pm 0,18$	$\pm 0,18$

1.2.3. Wirkung von gleichzeitiger oraler Kallikrein- und Glukosegabe bei pankreatektomierten Ratten auf die Glukoseutilisation (Versuchsanordnung III, sog. "Cocktail")

1.2.3.1. Ergebnisse bei der Kontrollgruppe

In dieser Versuchsreihe erhielten die 10 gesunden Ratten der Kontrollgruppe über eine Magensonde gleichzeitig 10000 KE/kg KG bzw. NaCl und 0,5 g Glukose in einem ml Wasser gelöst mit einem Zusatz von 0,1 ml Serum (fetales Kälberserum, Gibco). Der Blutzucker wurde wie üblich 2 mal vor sowie 10, 20, 25, 30, 35, 40, 60 und 80 Minuten nach dem "Cocktail" bestimmt.

In dieser Gruppe zeigt sich nach oraler Verabreichung von Glukose zusammen mit Kallikrein und Serum nur ein geringfügiger Anstieg des Blutzuckers, ähnlich dem Versuch Ib, in dem die Glukose ebenfalls oral appliziert wurde.

Bei 3 Tieren kommt es nach der Glukosegabe zu keinem Anstieg des Blutzuckerspiegels, wie das Beispiel von Tier 205 deutlich zeigt (Abb. 9). In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der K-Werte zusammengefaßt: In der Versuchsanordnung III liegen die K-Werte etwas niedriger als bei Versuchsanordnung Ib. Zwischen den Kontroll-K-Werten und den Kallikrein-K-Werten besteht ein geringer, jedoch nicht signifikanter Unterschied.

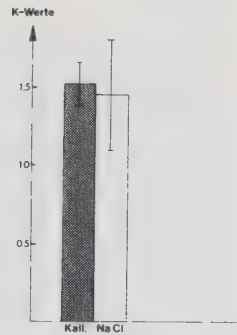
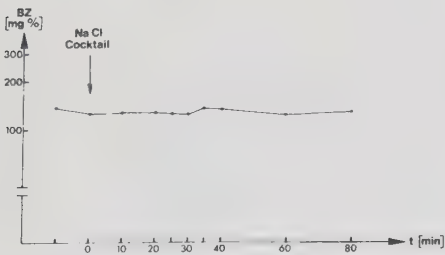
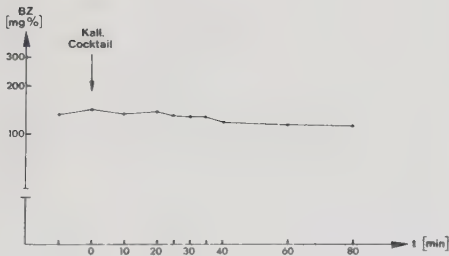


Abb. 9: links: Typische Blutzuckerkurve einer Ratte aus der Kontrollgruppe bei gleichzeitiger oraler Glukose- und Kallikrein/NaCl-Gabe (VIII)

rechts: Mittlere K-Werte der Kontrollgruppe bei Versuchsanordnung III

Tab. 9:

K-Werte der Kontrollgruppe bei gleichzeitiger oraler Glukose- und Kallikrein/NaCl-Gabe (Versuchsanordnung III)

Tier-Nr.	K _{Ka11}	K _{NaCl}	Δ K
200	∅	∅	∅
201	1,65	1,46	0,19
202	1,60	1,23	0,37
203	1,62	0,95	0,67
204	1,54	1,75	- 0,21
205	∅	∅	∅
206	1,6	1,95	- 0,35
207	1,33	∅	∅
208	∅	∅	∅
209	1,32	1,37	- 0,05
Mittel	1,52	1,45	0,10
s	± 0,14	± 0,36	± 0,38
p			n. s.

1.2.3.2. Ergebnisse bei der zweiten Pankreatektomieserie (P_2)

In dieser Versuchsserie wurde wie bei der Kontrollgruppe gleichzeitig mit 0,5 g Glukose und Kallikrein (in einer Dosierung von 10000 KE/kg KG) auch Serum als Kininogenzusatz oral verabreicht (Versuchsordnung III). Der Versuch wurde mit allen Tieren aus der zweiten Pankreatektomieserie ($n = 21$) 15 bis 18 Tage nach der Operation durchgeführt. Gegenüber der Kontrollgruppe wurden die Blutzuckerentnahmezeiten etwas geändert, und zwar wurde 30, 60, 75, 120, 150, 180 und 240 Minuten nach dem "Cocktail" sowie zweimal vor der Verabreichung des "Cocktails" der Blutzucker bestimmt.

Eine typische Verlaufskurve der Blutzuckerwerte bei dieser Versuchsanordnung zeigt Abbildung 10. In Tabelle 10 sind die Einzelwerte aller Versuchstiere zusammengefaßt. Die K-Werte der Kallikreingruppe betragen im Mittel 0,69 und die der Kontrollgruppe 0,46. Die Steigerung des K-Wertes durch Kallikrein machte durchschnittlich 0,16 aus und ist mit $p = 5\%$ signifikant.

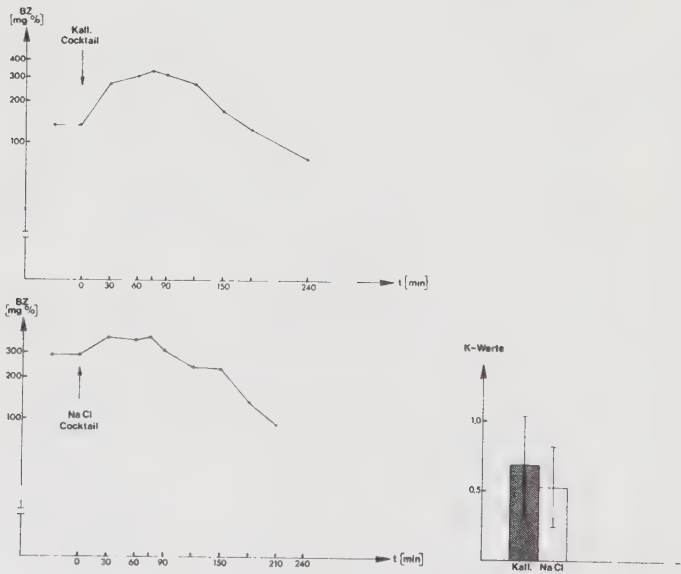


Abb. 10: links: Typische Blutzuckerkurve einer Ratte aus der zweiten Pankreatektomieserie (P₂) nach gleichzeitiger oraler Kallikrein/NaCl- und Glukosegabe (Versuchsanordnung III)

rechts: Mittlere K-Werte der zweiten Pankreatektomieserie (P₂) bei Versuchsanordnung III

Tab. 10:

K-Werte der zweiten Pankreatektomieserie (P_2) bei gleichzeitiger oraler Applikation von Glukose und Kallikrein- bzw. NaCl (Versuchsanordnung III)

Tier-Nr.	K_{Kall}	K_{NaCl}	ΔK	
178	1,16	0,64	0,52	
179	0,35	0,34	0,01	
180	0,25	0,24	0,01	
181	0,41	0,35	0,06	
182	0,61	0,37	0,24	
183	Ø	Ø	Ø	
184	0,75	0,67	0,06	
185	Ø	Ø	Ø	
186	1,28	0,82	0,46	
187	0,55	0,23	0,32	
188	0,46	Ø	Ø	
189	0,78	0,46	0,32	
190	Ø	Ø	Ø	
191	0,87	0,38	0,49	
192	0,46	0,43	0,03	
193	Ø	Ø	Ø	
194	0,64	0,43	0,21	
195	0,61	0,60	0,01	
196	0,72	0,53	0,19	
197	0,31	0,44	- 0,13	
198	0,58	0,52	0,06	
Mittel	0,63	0,46	0,18	
s	$\pm$ 0,28	$\pm$ 0,16	$\pm$ 0,18	

1.2.4. Ergebnisse des oralen Glukose-Toleranz-Tests (oGTT)
bei der zweiten Pankreatektomieserie (P₂)

In dieser Gruppe wurde ein oraler Glukose-Toleranz-Test 10 bis 12 Tage nach der Operation durchgeführt. Der morgendliche Blutzucker lag im Mittel bei 194 mg/100 ml. Ein Tier (179) wurde wegen eines deutlichen Ikterus von der Untersuchung ausgeschlossen und bei weiteren drei Ratten dieser Gruppe konnte kein K-Wert bestimmt werden. In dieser Gruppe verblieben also 17 Tiere, bei denen keine eindeutige Korrelation zwischen dem morgendlichen Blutzucker (über 200 mg/100 ml) und dem K-Wert (unter 0,5) zu finden war, weshalb auch auf eine Differenzierung in leicht und schwer diabetische Tiere verzichtet wurde. In keinem Fall war der K-Wert größer oder gleich 1,0, was auf die diabetische Stoffwechsellaage aller Tiere dieser Serie hinweist. In Tabelle 11 sind die morgendlichen Blutzucker, die K-Werte und jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung zusammengestellt.

Tab. 11:

Morgendliche Blutzuckerwerte und K-Werte nach oralem Glukose-Toleranz-Test bei der zweiten Pankreatektomieserie (P₂)

Tier-Nr.	BZ (mg %)	K-Wert
178	173	0,54
179	120	Ø
180	318	0,25
181	164	0,25
182	158	0,28
183	166	0,90
184	154	0,54
185	190	0,49
186	369	0,40
187	323	0,24
188	147	Ø
189	138	0,71
190	136	Ø
191	152	Ø
192	226	0,68
193	202	0,40
194	357	0,62
195	185	0,72
196	125	0,50
197	120	0,52
198	152	0,97
M $\pm$ s	194 $\pm$ 78	0,52 $\pm$ 0,23

1.2.5. Wirkung von Kallikrein bei streptozototindiatetischen Ratten auf die Glukoseutilisation

In diesem Abschnitt werden die Versuche und Ergebnisse bei den ausschließlich streptozototindiatetischen Ratten und bei den Kombinationsratten (P+S Gruppe) besprochen.

Die diabetogene Wirkung von Streptozototin ist einmal abhängig von der Dosis, zum anderen von der Applikationsart und nicht zuletzt von der verwendeten Spezies, wobei offensichtlich auch Unterschiede in den verwendeten Tierstämmen eine Rolle spielen (60). Bei der hier verwendeten Dosierung von 2 mal 50 mg intraperitoneal an zwei aufeinanderfolgenden Tagen trat nach 2 Tagen bei allen Tieren eine Blutzuckererhöhung von im Mittel auf 360 mg/100 ml auf. Keines der Versuchstiere starb unmittelbar nach der Injektion von Streptozototin während der aus der Literatur bekannten Hypoglykämiephase.

1.2.5.1. Kallikreineffekt bei der Streptozototingroup (S) auf die Glukoseutilisation nach i.p. Glukosebelastung (Versuchsanordnung IIa)

Zwei bzw. vier Wochen nach der letzten Streptozototininjektion wurde mit den verbliebenen Tieren dieser Versuchsgruppe ein Akutversuch durchgeführt.

Dabei wurde Kallikrein (1000 KE/kg KG) bzw. NaCl nicht wie bei den vorher beschriebenen Versuchen vor, sondern nach der Glukose intraperitoneal appliziert (Versuchsanordnung IIa). Die Glukosegabe (0,5 g) erfolgte ebenfalls intraperitoneal. Die Blutzuckerwerte wurden doppelt vor der Glukosegabe und 30, 45 und 120 Minuten danach und bis zur 8. Stunde stündlich ermittelt. Da in dieser schwer diabetischen Gruppe ein deutlicher Blutzuckerabfall erst 3 bis 4 Stunden nach der Glukosebelastung auftritt und Kallikrein bzw. NaCl 2 Stunden nach der Glukose verabreicht wurde, ist es möglich, einen K-Wert, der durch Kallikrein bzw. NaCl beeinflußt ist, zu berechnen. Abbildung 11 zeigt eine typische Blutzuckerkurve. Bei einem morgendlichen Blutzucker von über 200 mg/ 100 ml erreicht der Blutzuckerspiegel etwa 45 Minuten nach der Belastung ein Maximum und bleibt etwa 2 bis 4 Stunden auf gleicher Höhe, bevor es zu einem klaren Abfall kommt.

In Tabelle 12 sind die K-Werte dieser Versuchsgruppe zusammengestellt. Wegen der geringen Fallzahl in dieser Gruppe kann keine statistisch gesicherte Aussage gemacht werden, jedoch ist eine deutliche Tendenz zu einer Steigerung der K-Werte durch Kallikrein zu verzeichnen.

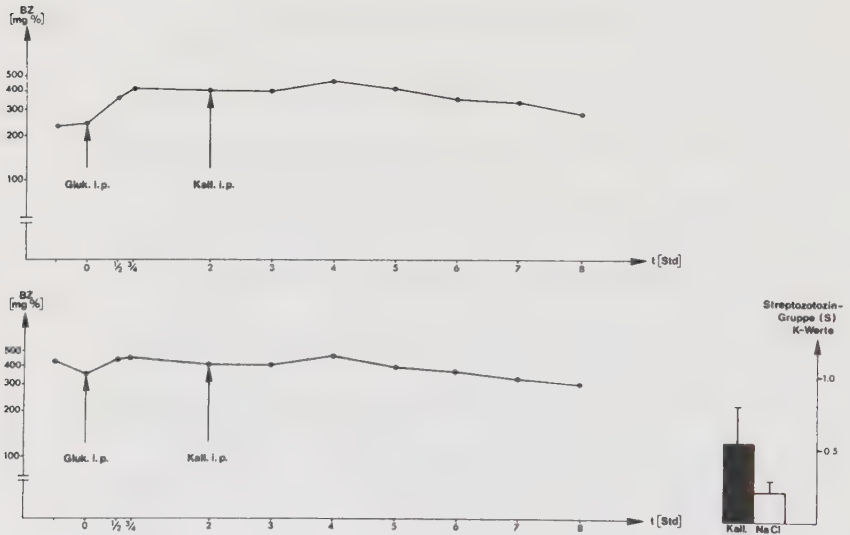


Abb.11: links: Typische Blutzuckerkurve einer Ratte der Streptozotocin-Gruppe bei intraperitonealer Glukosebelastung und nachfolgender i.p. Kallikrein/NaCl-Gabe

rechts: Mittlere K-Werte der Streptozotocin-Gruppe bei Versuchsanordnung II.

Tab. 12:

K-Werte der Streptozotozingruppe (S) bei intraperitonealer Glukosebelastung und nachfolgender Kallikrein/NaCl-Applikation.

Tier-Nr.	K _{Kall}	K _{NaCl}	Δ K
151	∅	0,20	∅
152	0,81	0,18	0,63
154	0,56	0,31	0,25
155	0,47	0,11	0,36
159	0,72	(*)	∅
161	∅	0,16	∅
163	0,24	0,25	- 0,01
Mittel	<u>0,52</u>	<u>0,20</u>	<u>0,31</u>
s	<u>± 0,24</u>	<u>± 0,07</u>	<u>± 0,27</u>

1.2.5.2. Wirkung von Kallikrein i.p. bei der Kombinationsgruppe (P+S) nach i.p. Glukosebelastung
(Versuchsanordnung Ia)

Diese aus insgesamt 19 Tieren bestehende Gruppe wurde etwa ein halbes Jahr nach einer Pankreatektomie, die nur zu einem Prädiabetes geführt hatte, zusätzlich mit einer sehr niedrigen Streptozotocindosis (2 mal 5 mg i.p.) behandelt. Nach dieser Behandlung stellte sich bei 8 Tieren eine Verschlechterung der Stoffwechsellage ein, worauf sowohl der morgendliche Blutzucker als auch die K-Werte nach einem intraperitonealen Glukose-Toleranz-Test (s.S. hinweisen.

Bei allen Tieren dieser Gruppe wurde die Wirkung von intraperitoneal appliziertem Kallikrein bzw. NaCl auf die intraperitoneale und orale Glukosebelastung untersucht. Dabei wurde wie üblich der Blutzucker doppelt vor der Kallikrein- bzw. NaCl-Applikation bestimmt und die Glukose zwei Stunden danach verabreicht. Weitere Blutzuckerbestimmungen erfolgten 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 und 240 Minuten nach der Glukosebelastung.

In Tabelle 13 sind die K-Werte der schwer diabetischen und in Tabelle 14 die K-Werte der leicht diabetischen Versuchstiere der Kombinationsgruppe bei intraperitonealer Applikation von Kallikrein

aufgeführt. Aus den beiden Tabellen wird ersichtlich, daß in der Gruppe der schwer diabetischen Versuchstiere ($P+S_2$) die Tendenz einer K-Wert-Erhöhung unter Kallikreineinwirkung besteht (s. Tab. 13), nicht dagegen in der Gruppe der leicht diabetischen Versuchstiere ($P+S_1$). Da die schwer diabetische $P+S_2$ -Gruppe nur 6 Tiere umfaßt, kann keine statistische Auswertung erfolgen. Das Ergebnis in der leicht diabetischen $P+S_1$ -Gruppe, die aus 12 Tieren besteht, ist für die K-Wertdifferenz nicht signifikant.

Tab. 13:

K-Werte der schwer diabetischen Kombinationsratten (P + S₂)
bei Versuchsanordnung I a

Tier-Nr.	K _{Kall}	K _{NaCl}	Δ K
82	0,83	0,62	0,21
83	0,54	0,30	0,24
88	0,67	0,43	0,24
91	0,93	0,47	0,46
93	0,59	0,55	0,04
102	∅	0,52	∅
Mittel	0,71	0,48	0,24
s	± 0,16	± 0,11	± 0,15

Tab. 14:

K-Werte der leicht diabetischen Kombinationsratten (P + S₁)
bei der Versuchsanordnung I a

Tier-Nr.	K _{Kall}	K _{NaCl}	Δ K
76	0,53	0,42	0,11
77	0,68	1,32	- 0,64
80	0,62	0,60	0,02
86	0,66	0,32	0,34
90	0,96	0,54	- 0,42
94	0,41	0,46	0,05
100	1,17	1,41	- 0,24
104	0,75	0,95	- 0,22
106	0,56	1,14	- 0,58
144	∅	0,45	∅
145	1,52	0,48	1,04
146	0,51	0,43	0,08
Mittel	0,76	0,71	- 0,04
s	± 0,33	± 0,39	± 0,47
p			n.s.

1.2.5.3. Wirkung von Kallikrein bei der Kombinationsgruppe
(P+S) nach oraler Glukosebelastung
(Versuchsanordnung Ib)

Bei 6 schwer diabetischen und 12 leicht diabetischen Tieren dieser Gruppe wurde 2 Stunden vor einer oralen Glukosebelastung Kallikrein in einer Dosierung von 10000 KE/kg KG intraperitoneal verabreicht, während die Kontrollgruppe wieder ein entsprechendes Volumen NaCl erhielt, und die K-Werte errechnet. Wie aus Tabelle 15 hervorgeht, reicht die Fallzahl für eine statistische Auswertung nicht aus, jedoch zeigt sich bei den schwer diabetischen Tieren der P+S₂-Gruppe eine deutliche Tendenz zur Erhöhung der K-Werte unter Kallikreineinwirkung.

In der Gruppe der leicht diabetischen Tiere (P+S₁) findet man in der Kontrollgruppe geringgradig höhere K-Werte als in der Kallikreingruppe. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. In Tabelle 16 sind die Einzel- und Mittelwerte mit den Standardabweichungen zusammengefaßt.

Tab. 15:

K-Werte der schwer diabetischen Kombinationsratten (P + S₂)
bei Versuchsanordnung I b

Tier-Nr.	K _{Kall}	K _{NaCl}	Δ K
82	0,93	0,23	0,70
83	∅	∅	∅
88	0,84	0,35	0,49
91	0,46	0,71	- 0,25
93	0,51	0,38	0,13
102	0,59	∅	∅
Mittel	0,67	0,42	0,27
s	± 0,21	± 0,21	± 0,42

Tab. 16:

K-Werte der leicht diabetischen Kombinationsratten (P + S₁)
bei Versuchsanordnung I b

Tier-Nr.	K _{Kall}	K _{NaCl}	Δ K
76	0,31	0,69	- 0,38
77	0,57	0,81	- 0,24
80	1,00	1,37	- 0,37
86	0,50	1,18	- 0,68
90	0,75	∅	∅
94	0,91	0,28	0,63
100	0,61	0,58	0,03
104	0,31	0,65	- 0,34
106	0,87	∅	∅
144	1,11	1,02	0,09
145	0,45	∅	∅
146	0,75	0,34	0,41
Mittel	0,68	0,77	- 0,09
s	± 0,26	± 0,30	± 0,41

1.2.6. Intraperitonealer Glukose-Toleranz-Test (i.p.GTT)
bei der Streptozotozingruppe (S) und bei der
Kombinationsgruppe (P+S)

Bei den streptozotozindiabetischen Ratten wurde 2
Tage nach der Applikation dieser Substanz an 14
Tieren eine intraperitoneale Glukosebelastung
durchgeführt und der K-Wert ermittelt. In Tabelle
17 sind die Einzelwerte dieser Gruppe (morgendliche
Blutzuckerwerte und K-Werte) zusammengestellt.

Beide Größen weisen auf die Ausbildung eines mani-
festen, schweren Diabetes mellitus hin.

Drei und vier Tage nach der Streptozotozininjektion
wurde in dieser anfangs 19 Tiere umfassenden Gruppe
(P+S) ein intraperitonealer Glukose-Toleranz-Test
durchgeführt. Während des Versuches starb ein Tier.
Von 7 Tieren, deren K-Werte unter 0,5 lagen, war
auch der morgendliche Blutzucker über 200 mg/100 ml,
so daß hier eine gute Übereinstimmung zwischen mor-
gendlichen Blutzucker- und K-Werten für die Differen-
zierung in einen schweren und leichten Diabetes be-
steht. Nur Tier 91 hatte einen morgendlichen Blut-
zucker von 236 mg/100 ml, der K-Wert lag jedoch mit
0,57 über dem festgesetzten Grenzwert von 0,5. Tabel-
le 18 gibt die einzelnen Werte dieser Gruppe wieder.

Tab. 17:

Blutzucker- und K-Werte aus dem intraperitonealen Glukose-Toleranz-Test bei der Streptozotozingruppe (S)

Tier-Nr.	BZ (mg %)	K-Wert
150	403	0,34
151	365	0,22
152	370	0,20
153	400	0,17
154	368	0,28
155	428	0,67
156	296	0,32
157	317	Ø
158	343	0,53
159	350	0,28
160	341	0,41
161	400	0,18
162	322	0,41
163	337	0,27
Mittel	360	0,33
s	$\pm$ 36	$\pm$ 0,15

Tab. 18:

Blutzucker- und K-Werte nach intraperitonealem Glukose-Toleranz-Test bei den Kombinationsratten (P + S)

Tier-Nr.	BZ (mg/100 ml)	K-Wert
77	126	0,89
82*	290	0,16
83*	306	0,16
86	123	0,74
88*	339	0,31
89	141	(*)
90	134	1,30
91*	236	0,57
93*	272	0,25
94	122	0,51
97*	345	0,39
98*	247	0,25
100	135	1,05
102*	368	0,36
104	147	0,91
106	113	0,89
144	149	0,96
145	136	0,88
146	139	0,58
Mittel	204	0,62
leicht diabet. (P + S ₁) n = 11	133	0,84 $\pm$ 0,24
*schwer diabet. (P + S ₂) n = 8	300	0,27 $\pm$ 0,08

Tab. 19:

K-Wert-Tabulle - Zusammenfassung aller Versuche

Gruppe	Versuchs-anordnung I a			Versuchs-anordnung I b			Versuchs-anordnung III		
	K _{Kall}	K _{NaCl}	ΔK	K _{Kall}	K _{NaCl}	ΔK	K _{Kall}	K _{NaCl}	ΔK
Kontrolle	2,47 ± 1,27	2,24 ± 1,13	0,33 ± 1,2	2,02 ± 0,48	1,85 ± 0,66	± 0	1,52 ± 0,14	1,45 ± 0,36	0,10 ± 0,38
1. Serie P ₁	1,31 ± 0,34	0,62 ± 0,19	0,69 ± 0,43	1,00 ± 0,3	1,04 ± 0,28	- 0,04 ± 0,41			
2. Serie P ₂	1,36 ± 0,7	0,88 ± 0,25	0,48 ± 0,73	0,67 ± 0,15	0,47 ± 0,23	0,29 ± 0,28	0,69 ± 0,36	0,53 ± 0,29	0,16 ± 0,28
P ₃	0,36 ± 0,2	0,34 ± 0,13	0,05 ± 0,19	0,48 ± 0,18	0,46 ± 0,18	∅			
S	0,52 ± 0,24	0,20 ± 0,07	0,31 ± 0,27						
P + S ₁ , leicht	0,76 ± 0,33	0,71 ± 0,39	- 0,04 ± 0,47	0,68 ± 0,26	0,77 ± 0,30	- 0,09 ± 0,41			
P + S ₂ schwer	0,71 ± 0,16	0,48 ± 0,11	0,24 ± 0,15	0,67 ± 0,21	0,42 ± 0,21	0,27 ± 0,42			

Tab. 19 a:

K-Wert-Tabelle;
Anzahl der Tiere, bei denen der K-Wert bestimmt wurde;
Zeitpunkt bzw. Tage nach Operation;
für K - Wahrscheinlichkeit (p)

Gruppe	V I a			V I b			V I I I		
	K _{Kall}	K _{NaCl}	ΔK	K _{Kall}	K _{NaCl}	ΔK	K _{Kall}	K _{NaCl}	ΔK
Kontrolle	n=9	n=9	n=9 n.s.	n=7	n=10	n=7 p ∅	n=7	n=6	n=6 p ∅
1. Serie P ₁	n=12 14-18p.op.	n=12	n=12 p ≤ 0,1%	n=12 25-31p.op.	n=12	n=12 n.s.			
2. Serie P ₂	n=18 33-39p.op.	n=17	n=17 p ≤ 1 %	n=16 27-32p.op.	n=15	n=13 p ≤ 5 %	n=21 15-18p.op.	n=21	n=21 p ≤ 5 %
P ₃ schwer	n=5	n=4	n=4 p ∅	n=3	n=2	∅ ∅			
S	n=4 2-4 Wo. n. Streptozot.	n=6	n=4 p ∅						
P+S ₁ leicht	n=11 5/7 Wo. n. Streptozot.	n=12	n=11 n.s.	n=12 8/11 Wo. n. Streptozot.	n=9	n=9 n.s.			
P+S ₂ schwer	n=5 4-6 Wo. n. Streptozot.	n=6	n=5 p ∅	n=5 8/12 Wo. n. Streptozot.	n=4	n=4 p ∅			

P+S: Etwa 6 Monatenach der Operation Streptozotozingabe

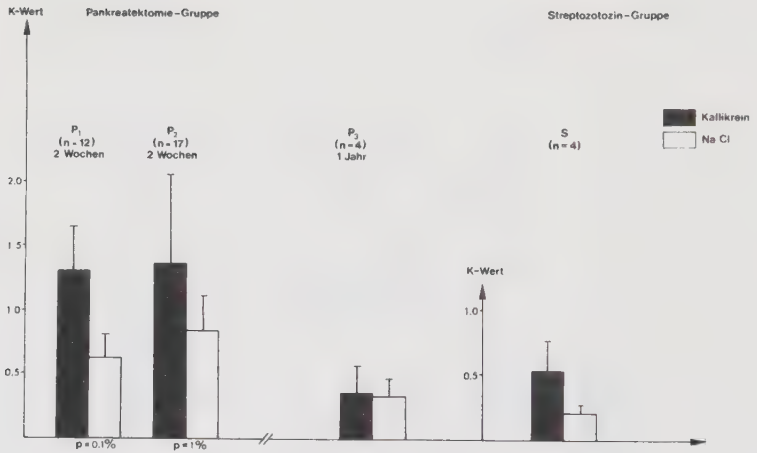


Abb. 12: Übersicht über die mittleren K-Werte der Pankreatektomiegruppen (P₁ bis P₃) und der Streptozotizingruppe (S) bei intraperitonealer Kalikreinivorbehandlung und nachfolgender intraperitonealer Glukosebelastung

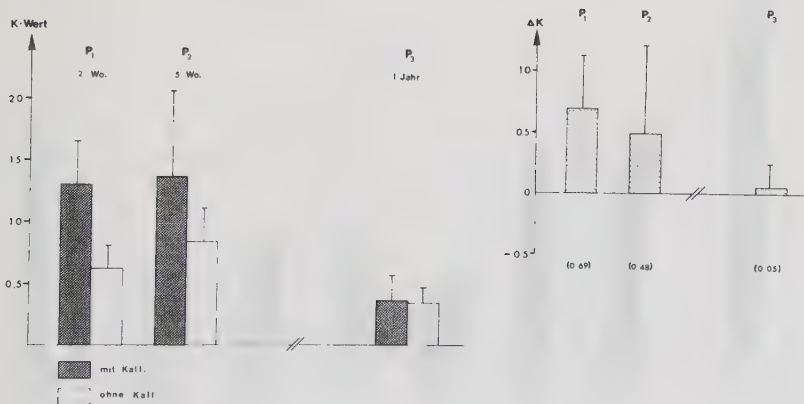


Abb. 13: links: Wirkung von intraperitonealem Kallikrein auf die K-Werte bei nachfolgender intraperitonealer Glukosegabe bei den Pankreatektomieratten (P) in Abhängigkeit vom Zeitraum nach der Operation im Vergleich zu den NaCl-Kontrollen (Versuchsanordnung I a)

rechts: K-Wert-Differenz bei den Pankreatektomieratten bei Versuchsanordnung I a

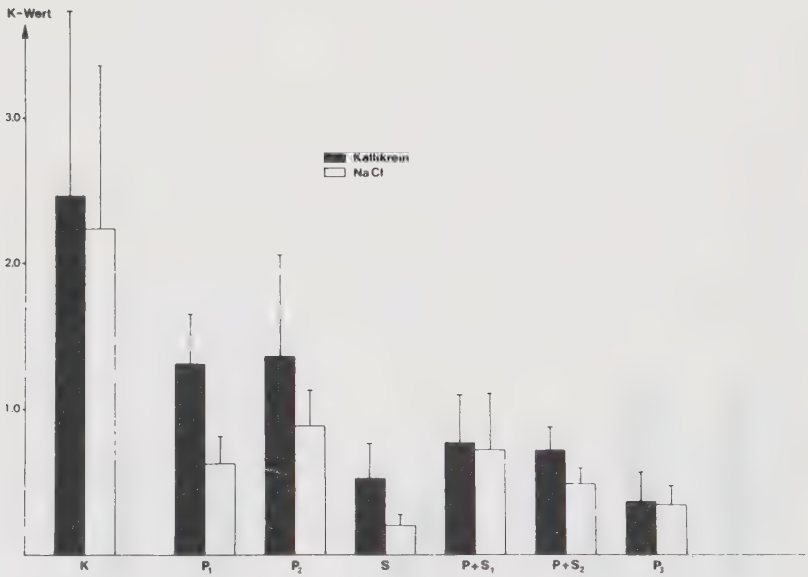


Abb. 14: Übersicht über die K-Werte bei Versuchsanordnung I a
(i.p. Kalikrein/NaCl-Vorbehandlung und nachfolgend
i.p. Glukosebelastung)

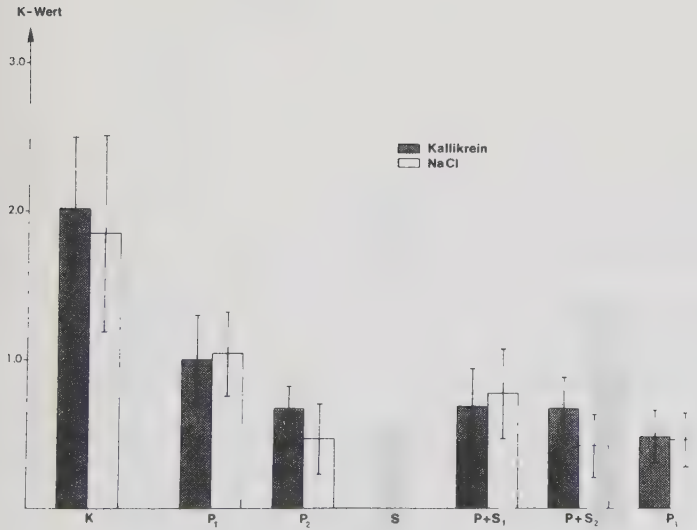


Abb. 15: Übersicht über die K-Werte bei Versuchsanordnung I b (Kallikrein/NaCl-Vorbehandlung und nachfolgend orale Glukosebelastung)

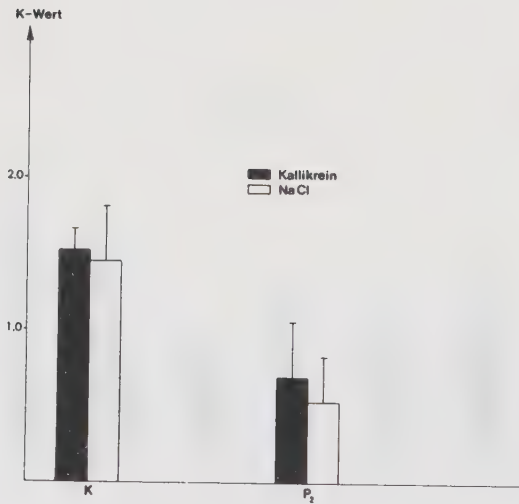


Abb. 16: Übersicht über die K-Werte bei Versuchsanordnung III ("Cocktail: gleichzeitige orale Gabe von Kallikrein/NaCl und Glukose)

1.3. Diskussion

Durch intraperitoneale und orale Kallikreingabe konnte eine signifikante Steigerung der K-Werte bei pankreatektomierten Ratten erzielt werden. Da im allgemeinen die Kallikreineffekte durch eine Kininfreisetzung erklärt werden und Publikationen vorliegen, daß das in dieser Untersuchung verwendete Schweinepankreaskallikrein kein Kinin von Rattenkininogen abspaltet (12), (36), wurde zusätzlich geprüft, ob nicht doch eine solche Kininfreisetzung gezeigt werden kann. Dies erschien besonders wichtig, da auch andere Untersucher (45), (54), (42), (51), (60), (27) Effekte durch Gaben von Schweinepankreaskallikrein auf die Zellproliferation, die Resorption, die Spermatogenese beobachtet haben, ohne auf diesen Widerspruch einzugehen. Es wurde zur Klärung die Wirkung von Schweinepankreaskallikrein auf den mittleren Blutdruck bei gesunden Ratten gemessen und gefunden, daß ausgesprochen hohe Dosen (ab 1000 KE/kg KG i.v.) notwendig sind, um den klassischen Kinineffekt, nämlich eine Blutdrucksenkung zu erzielen. Allerdings zeigte sich eine gegenüber arteigenem Kallikrein (Rattenurin, Extrakt aus der Submandibularisdrüse der Ratte) veränderte Kinetik (7). Der Gedanke, einen Kallikreineffekt bei pankreatektomierten Ratten auf einen endogenen Kallikreinmangel zurückzuführen, liegt nahe, jedoch läßt sich diese These

nicht aufrechterhalten, wenn man die Besonderheiten des Kallikrein-Kinin-Systems der Ratte selbst berücksichtigt. Nach Untersuchungen von Frey, Kraut und Werle enthält das Pankreas der Ratte nur 70 bis 80 KE/g Frischgewebe, die glandula submandibularis dagegen 3000 KE/g Frischgewebe, wobei maximal nur 10 % des Pankreaskallikreins als aktives Enzym, der größte Teil jedoch als inaktives Präkallikrein vorliegt (19). Dietl et al. (6) zeigten durch Immunfluoreszenz für das Schweinepankreas und Torill et al. (61) sowie Proud et al. (50) für das Rattenpankreas, daß Kallikrein in den Zellen der exokrinen Endstücke (Acini) lokalisiert ist. Nach neueren Untersuchungen soll es auch im Inselgewebe vorkommen (48).

Selbst wenn das Rattenpankreas 10 mal so schwer wäre wie die Glandula submandibularis, würde die Menge an aktivem Kallikrein bei der Ratte nur 1/40 ausmachen. Beim Menschen dagegen ist allein der Gehalt des Pankreas an Kallikrein 12 bis 25 mal höher als in der Submandibularisdrüse. Dies zeigt deutlich, daß eine Entfernung des Pankreas bei der Ratte keinen ausgeprägten Effekt auf endogenes Kallikrein haben kann.

Obwohl, wie Scow (57) gezeigt hat, bei Ratten eine totale Pankreatektomie möglich ist, die nach 18 Stunden zu einem manifesten Diabetes mellitus führt, haben

wir die subtotale Pankreatektomie nach Foglia (16) bevorzugt, da diese in den ersten Wochen nur zu einer mäßigen Blutzuckererhöhung führt und somit die diabetischen Sekundärfolgen bei unseren Versuchstieren in den ersten Monaten noch relativ gering sind. Diese "prädiabetische Phase" verläuft nach Martin und Lacy (44) in zwei Phasen ab. In der ersten Phase liegen die Blutinsulin- und Blutzuckerwerte noch im Normbereich, auch das Wachstum ist noch nicht gestört. Die Zweite Phase beginnt um den 20. postoperativen Tag und ist durch Hyperglykämie, Glukosurie und reduzierte Insulinspiegel gekennzeichnet. Morphologisch finden sich dabei in den Langerhans'schen Inseln des Restpankreas eine Degranulation der B-Zellen, Mitosen, Fibrosierungen und Glykogeneinlagerungen, so daß die verbliebenen Inselorgane funktionell insuffizient werden. Ähnliche morphologische Veränderungen finden auch Friedman und Marble (20). Die Prädiabetesdauer beträgt nach anderen Autoren (24) 3 bis vier Wochen.

Man kann also davon ausgehen, daß bei unseren Versuchen in den ersten Wochen post operationem noch Restpankreasgewebe, also auch Insulin, vorhanden war, wodurch extreme Blutzuckererhöhungen und andere Erkrankungen verhindert wurden.

Wie die Befunde zeigen, führt die intraperitoneale Injektion von Kallikrein, wenn diese zwei oder eine Stunde vor einer intraperitonealen Glukosebelastung

an pankreatektomierten Ratten durchgeführt wird, zunächst zu einem raschen und steileren Blutzuckeranstieg, dann aber nachfolgend zu einer schnelleren Reduktion der Blutzuckerwerte. Dieser Effekt, der bei Kallikreintieren zwei Stunden vor der Glukosebelastung besonders deutlich war und sich in einer Erhöhung der K-Werte um etwa das Doppelte ausdrückt, beruht wahrscheinlich darauf, daß die intraperitoneal injizierte Glukose bei den mit Kallikrein vorbehandelten Pankreatektomierten rascher resorbiert wird und dadurch die Blutzuckerwerte rascher und steiler ansteigen. Anschließend kommt es aber dann bei den Kallikreintieren wiederum zu einer rascheren Blutzuckersenkung. Diese raschere Senkung, die zu den gesteigerten K-Werten führt, könnte auf einer verbesserten Glukoseutilisation oder auch einer beschleunigten Penetration von Glukose in die Zellen hinein beruhen.

Zu ähnlichen Schlußfolgerungen kamen kürzlich auch Dietze und Mitarbeiter, die mit einem anderen Modell (2) gearbeitet haben. Es wurde gezeigt, daß das Kallikrein-Kinin-System am hypoxischen, ruhenden Muskel die muskuläre Glukoseaufnahme mit reguliert. Die durch Hypoxie ausgelöste, bekannte Steigerung der Glukoseextraktion (46) konnte durch Infusion von Kallikrein-Trypsin-Inhibitor (Trasylol^R) gehemmt werden, und durch zusätzliche Bradykinininfusionen (also Trasylol

und Bradykinin) gelang es, die normale, muskuläre Antwort auf die Hypoxie wiederherzustellen (9). Gleichfalls am Modell des infundierten Unterarms konnten Dietze und Mitarbeiter zeigen, daß Bradykinin neben einer Durchblutungssteigerung (^{133}Xe -washout) zu einer vermehrten, muskulären Glukoseaufnahme führt, die durch Indomethacinvorbehandlung hemmbar ist und damit vermutlich durch endogen synthetisierte Prostaglandine übertragen wird. (10).

Nach einer neueren Untersuchung kann auch die glukoseaufnahmefördernde Insulinwirkung am arbeitenden Muskel durch Trasylol gehemmt werden, sogar unter den Wert der Glukoseaufnahme unter alleiniger Arbeitsbelastung (66), was für eine Interaktion von Insulin und dem Kallikrein-Kinin-System spricht.

Da Kallikrein, wie einleitend erwähnt, niemals direkt in den Stoffwechseleingreift, sondern über die Freisetzung von Kininen aus Kininogenen und weiter durch die Prostaglandinbildung erst indirekt auf die glukoseverarbeitenden Gewebe einwirken kann, muß erwartet werden, daß bei unseren Versuchstieren Kininogen in ausreichender Menge vorhanden ist. Um diese wichtige Voraussetzung zu prüfen, haben wir bei drei Gruppen (insgesamt 74 Tiere) eines anderen Tierkollektivs den Gesamtkininogenspiegel im Blut bestimmt.¹

1. Die Bestimmungen wurden von Dr. R. Geyger, Institut für klin. Chemie, München, durchgeführt.

Dabei wurde festgestellt, daß bei allen drei Gruppen der Kininogenspiegel ausreichend hoch war, um die beobachteten Kallikreineffekte zu erklären. Die Beobachtung, daß bei den pankreatektomierten Tieren der Kininogenspiegel etwas reduziert war, weist darauf hin, daß die Pankreatektomie das Kallikrein-Kinin-System insgesamt nur wenig beeinflußt.

Gesamtkininogenspiegel ^① bei Ratten

Gruppe	(μ g BK/ml Plasma)	(ng BK/mg Protein)
Kontrollen (n = 20)	$0,30 \pm 0,07$	$5,4 \pm 1,0$
Pankrea- tektomie ^② (n=29)	$0,26 \pm 0,07$	$4,1 \pm 1,3$
Strepto- zotozin ^③ (n = 25)	$0,32 \pm 0,04$	$5,1 \pm 0,8$

- ① Die Bestimmung erfolgt nach Aktivierung des Plasmas mit hochgereinigtem Schweinepankreas-kallikrein am isolierten Rattenuterus.
- ② Kininogenbestimmung 10 bis 21 Tage post operationem.
- ③ In der Streptozotozingruppe erfolgte die Kininogenbestimmung 4 Tage nach der letzten Streptozotozininjektion.
- In dieser Gruppe wurden 4 x 12,5 mg des B-Zellen-Cytotoxins gespritzt.

Merkwürdig ist die Beobachtung, daß sich durch eine zweistündige Vorbehandlung mit Kallikrein größere Effekte erzielen lassen als nach einer Stunde Vorbehandlung. Auch sonst war die Kallikreinwirkung bei i.p. Kallikrein- und nachfolgender oraler Glukosegabe schwächer und am schwächsten bei gleichzeitiger oraler Kallikrein- und Glukoseapplikation.

Es ist denkbar, daß eine Injektion von Kallikrein in größeren Dosen diejenigen Gewebe, die noch nach dem operativen Eingriff in der Lage sind, Kallikreine und Kininogene zu produzieren, stimuliert und damit für die nachfolgende Glukosebelastung bessere Voraussetzungen schafft. Sicher spielt aber auch die Tatsache eine Rolle, daß die 1-Stunden-Versuche 35 bis 38 Tage post operationem, die 2-Stunden-Versuche dagegen 14 bis 18 Tage nach der Pankreatektomie durchgeführt worden sind. Zeigte sich jedoch bei diesem Versuch ganz allgemein, daß die Wirkung des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Glukoseutilisation umso geringer wird, je länger die Pankreatektomie zurückliegt, und je mehr die prädiabetische Phase in die manifeste Phase übergeht. Bei denjenigen Tieren, bei denen die Pankreatektomie etwa ein Jahr zurücklag, konnte schließlich überhaupt kein Kallikreineffekt mehr nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, daß es nach länger zurückliegender Pankreatektomie zu Verdickungen der

Basalmembranen (53) an der Niere kommt. Es wäre denkbar, daß eine derart verdickte Basalmembran im Gewebe des Skelettmuskels die Diffusion so verzögert, daß freigesetzte Kinine nicht mehr ihren Wirkort erreichen können.

Die weniger eindeutigen Effekte nach oraler Applikation dürften im wesentlichen methodisch bedingt sein, könnten aber auch mit der durch die Operation bedingten, veränderten Resorptionsbedingungen im Dünndarm zusammenhängen. Da enteral appliziertes Kallikrein nach seiner teilweisen Resorption (14) zunächst in die Leber gelangt und es bis jetzt keine Untersuchungen zu möglichen Effekten der Kinine auf den Leberstoffwechsel gibt (65), kann hier nur spekuliert werden, daß die hepatische Glukoseproduktion gesteigert wird und so der Effekt auf die K-Werte verwischt wird.

Es war daher naheliegend, die beobachteten Kallikreineffekte auch an Tieren zu prüfen, bei denen das exokrine Gewebe intakt blieb und lediglich die B-Zellen der Langerhans'schen Inseln zerstört worden sind. Dies läßt sich bekanntlich leicht durch Streptozototozin erzielen (55).

Unsere Versuche mit den Streptozototozin-Tieren zeigten zwar keine signifikante Steigerung der K-Werte, jedoch

eine gewisse Tendenz zu einer Verbesserung der Glukose-utilisation durch Kallikrein. Bei dem Schweregrad des Krankheitsbildes lassen sich jedoch diese Effekte nur schwer beurteilen, zumal die Blutzuckerwerte in allgemeinen bei diesen schwerkranken Tieren sehr hoch sind. Zusätzlich bedingen die hohen Blutzuckerwerte durch Logarithmierung bei der graphischen Bestimmung der K-Werte größere Ungenauigkeiten.

Da nach Streptozotozin mit Sicherheit die B-Zellen des Inselorgans zerstört sind (37), kann der beobachtete Effekt nicht auf einer Insulinfreisetzung beruhen. Man muß daher annehmen, daß die Kallikreinwirkung auf die Glukoseutilisation in unserem akuten Versuchsmodell weitgehend vom Insulin unabhängig ist.

T E I L II

Die Wirkung von Bradykinin auf die Insulinsekretion
isolierter Langerhans'scher Inseln
(In-vitro Versuche an der Ratte)

Wie aus den Ergebnissen des ersten Teils der Untersuchungen zu ersehen ist, beeinflußt exogen zugeführtes Kallikrein die Glukoseextraktion aus der Blutbahn heraus in positiver Weise und zeigt dadurch eine insulinähnliche Wirkung. Daher liegt der Gedanke nahe, daß Kallikrein indirekt über eine Stimulierung der B-Zellen und damit über eine gesteigerte Insulinsekretion wirkt. Befunde von Vance und Bragg (62), die mit der Wirkung von Kallikrein und Bradykinin auf die Insulinsekretion gearbeitet haben, wie auch Untersuchungen von Burr und Sharp (1), die die Wirkung von Prostaglandin E_1 ebenfalls auf die Insulinsekretion untersucht haben, weisen in diese Richtung.

Demgegenüber spricht die Wirksamkeit von Kallikrein auch in der Gruppe der Tiere mit absolutem Insulinmangel (S - und P_3 -Gruppe) gegen einen solchen Effekt auf die B-Zellen der Langerhans'schen Inseln.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird daher die Wirkung von Kallikrein auf die Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln, d. h. also in vitro mit Hilfe von Inkubationsversuchen untersucht.

Diese in vitro Versuche sind umso mehr wünschenswert, als einerseits die beobachteten Effekte auch auf indirekte Kreislaufwirkungen durch Kallikrein freigesetzte, vasoaktive Stoffe zurückgeführt werden könnten,

andererseits aber auch heute bereits Beobachtungen vorliegen, die auf einen gewissen funktionellen Zusammenhang zwischen Insulinproduktion und dem Kallikrein-Kinin-System hinweisen (48). Länger bekannt ist bereits, daß Insulin die Kininase II hemmt [(34), (68)] und damit den Kininspiegel erhöht. Auch die neueren Beobachtungen von Dietze und Wicklmayr weisen in dieselbe Richtung. Von den in vitro Versuchen an isolierten Inseln kann daher eine Abklärung dieser funktionellen Beziehungen erwartet werden.

2.1. Material und Methode

Langerhans'sche Inseln wurden aus dem Pankreas von männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 250 g gewonnen. Die Isolierung der Inseln aus dem Rattenpankreas erfolgte mit Hilfe der von Moskalewski (47) eingeführten Methode der Kollagenaseverdauung, Sedimentation (39), (38) und stufenweiser Abpipettierung unter dem Stereomikroskop. Besonderer Wert wurde dabei auf ein Calcium-angepaßtes Medium gelegt (Gey-Puffer, (22)). Die Einstellung des pH auf 7,4 erfolgte bei allen Medien durch ständige Carbogenbegasung (95 % O₂ und 5 % CO₂). Die so isolierten Inseln wurden anschließend bei verschiedenen Glukose- und auch Bradykininkonzentrationen inkubiert. Nach der Inkubation wurde Medium zur Insulinbestimmung sofort tiefgefroren und die Inseln fixiert und wie üblich für die Elektronenmikroskopie in Epon eingebettet.

2.1.1. Isolierung einzelner Langerhans'scher Inseln

Bei in Äther getöteten Ratten wird nach Eröffnung des Bauches und Verlagerung des gesamten Dünndarms nach rechts der gemeinsame Pankreas- und Gallengang möglichst nahe der Duodenalwand abgeklemmt und lebernahe mit einer Kanüle (Nr. 20) punktiert. Danach werden 10 ml des Isolationspuffers (Gey-Puffer)

mit einer Glukosekonzentration von 0,5 g/l) in den Gang injiziert, wodurch das Pankreas bis zum Milzhilus gebläht wird. Das Pankreas wird anschließend möglichst vollständig extirpiert, wobei darauf geachtet wird, daß keine großen Gefäße eröffnet werden (Insulinaseaktivität von Blut). Fettgewebe und Lymphknoten werden makroskopisch abpräpariert, das Pankreas in eine Petrischale gegeben und, so weit wie nötig, mit frischem Isolationspuffer nachgebläht. Das Drüsengewebe wird mit einer Schere in möglichst gleichmäßige, kleine Stückchen geschnitten, wobei zweibis dreimal mit frischen Puffer gespült wird und restliches Fettgewebe abschwimmt. Der Gewebsbrei wird in einer Spritze aufgezogen und auf 10 ml Volumen mit Isolationspuffer aufgefüllt. Dieser Brei wird in ein fest verschließbares Schüttelgefäß, das 10 mg Kollagenase (Kollagenase, Fa. Serva, lyophilisiert, reinst, 380 Mandl U/mg) enthält und in ein Schüttelbad bei einer Temperatur von 37⁰ C und einer Frequenz von 280/min gegeben und für etwa 8 bis 12 Minuten inkubiert. Die Kollagenaseverdauung wird beendet, wenn der Inhalt des Schüttelgefäßes milchig-trüb ist und keine größeren Gewebsbröckchen mehr erkennbar sind (Schüttelinkubator, Fas. Köttermann, Längsschüttler, f = 0 bis 280/min). Die kollagenaseverdaute Gewebssuspension wird durch ein Stahlsieb (normales Teesieb) in einen eiskühlten 25 ml fassenden, 7 cm hohen Glaszylinder

gespritzt und mit Isolationspuffer aufgefüllt, um die Kollagenase- und tryptische Aktivität zu entfernen. Die Suspension läßt man 3 bis 4 Minuten sedimentieren. Der "Überstand" wird abgesaugt und das Sediment erneut mit frischer Gey-lösung aufgeschwemmt. Die Sedimentation und das Aufschwemmen werden drei bis vier mal wiederholt, um die Kollagenase so weit wie möglich zu entfernen. Der "Überstand" wird mikroskopisch auf Langerhans'sche Inseln kontrolliert. Das letzte Sediment wird im Eisbad aufbewahrt und davon Suspension in ein Kristallisiergefäß getropft, das frischen Isolationspuffer enthält. Aus diesem Gefäß werden die Langerhans'schen Inseln unter dem Stereomikroskop bei einer 250-fachen Vergrößerung in ein zweites, eisgekühlte Geylösung enthaltendes Kristallisiergefäß pipettiert (Stereomikroskop Wild, Zoom M 7S, Vergrößerung bis etwa 300-fach; Pipetten: 5 ul Konstriktionspipetten, silikonisiertes Glas). Die Langerhans'schen Inseln heben sich deutlich durch ihre ovoide Form und gelbliche Färbung ab. Durch das Abpipettieren des Sedimentes erreicht man eine erste Anreicherung von Inseln im eisgekühlten Kristallisiergefäß. Diese erste Anreicherung dauerte je nach Ausbeute an Inseln 45 bis 90 Minuten. Die Inseln werden so lange umpipettiert, bis kein exokrines Gewebe mehr sichtbar ist, also ausschließlich Inseln im Puffer schwimmen.

Durchschnittlich mußte drei-bis vier mal umpipettiert werden. Die Ausbeute lag zwischen 100 und 300 Inseln. Die gesamte Dauer der Isolation belief sich auf eine bis zwei Stunden. Die Zeit der Kollagenaseverdauung und auch die Konzentration mußte gegenüber derjenigen von Gerner et al. (22) angegebenen wesentlich verkürzt bzw. vermindert werden, um die auch dort beschriebene Schädigung der Inseln durch das Enzym zu vermeiden. (380 E/ml und 12 min gegenüber Gerner et al.: 940 E/ml und 17 min). Neben der Verdauung durch Kollagenase besteht zusätzlich bei der Reinigung der Inseln die Gefahr der Schädigung durch freigesetzte und aktivierte Enzyme des exokrinen Pankreasgewebes.

Daher ist eine vollständige Abtrennung der Acini und vollständige Reinheit der Inseln wichtig. Wie die Fotos (Abb. 17 a - c) vom Reinigungsgang zeigen, ist in der dritten Fraktion kein exokrines Gewebe mehr im Medium und auch den Inseln haften keine Acini mehr an.

Wichtig für das Gelingen der Inselisolierung ist auch das vollständige Blähen des Organs in situ. Wir haben beobachtet, daß dadurch die Ausbeute an Inseln, wie auch die Reinheit erheblich vergrößert wird.

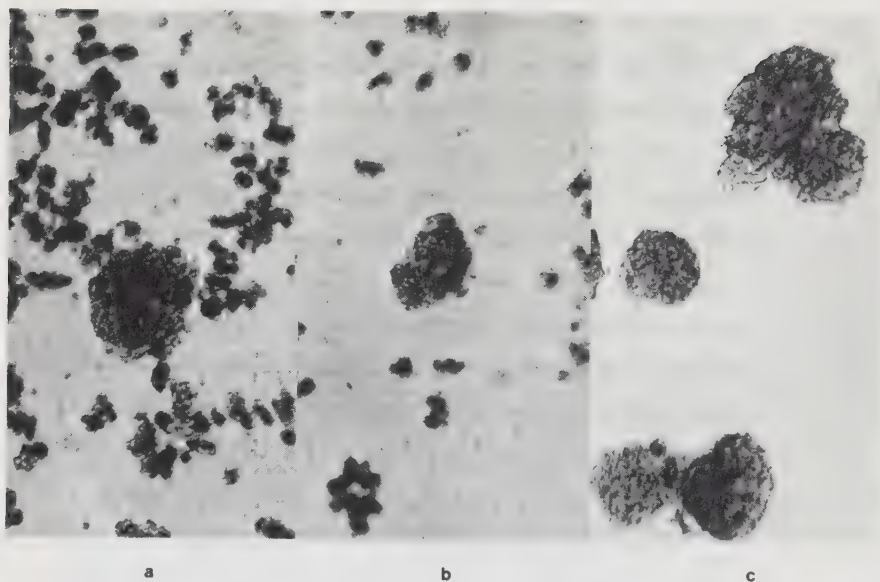


Abb. 17 a - c:

Langerhans'sche Inseln

a: Nach Verdauung und 1. Anreicherung (1. Fraktion)

b: Nach der 2. Anreicherung (2. Fraktion)

c: Nach vollständiger Reinigung (3. Fraktion)

(Orig. Vergr. von 17a und b etwa 30-fach, von 17b etwa 40-fach)

2.1.2. Inkubation

Die Gesamtheit der so gewonnen, isolierten Langerhans'schen Inseln aus dem Rattenpankreas wurden zur Synchronisation vorinkubiert. Zur Vorinkubation wurde ein Gey-Puffer mit einer Glukosekonzentration von 300 mg/100 ml und einem Zusatz von 0,5% Albumin (Serumalbumin von Rind, trocken, elektrophoretisch gereinigt, Behring-Werke) verwendet. Die Vorinkubation wurde in 10 ml Puffer bei 37° C unter Carbogenbegasung über 30 Minuten durchgeführt (Schüttelfrequenz etwa 60/min).

Nach Beendigung der Vorinkubation wurden die Inseln mit eiskaltem Isolationspuffer dreimal gewaschen und je 20 Inseln in 4 ml eiskaltes Inkubationsmedium pipettiert (entsprechend 5 Inseln/ml Medium). Für die eigentliche Inkubation wurde dann Gey-Puffer mit drei verschiedenen Glukosekonzentrationen, und zwar 0,5 g/l Glukose (G_1), 2,0 g/l Glukose (G_2) und 3,0 g/l Glukose (G_3), ebenfalls mit 0,5%igem Albuminzusatz verwendet. Das Inkubationsmedium K_4 entspricht G_1 mit einem Zusatz von Bradykinin von 2, 20 oder 200 ng/ml, K_5 entspricht G_2 mit Bradykinin und K_6 entspricht G_3 mit Bradykinin.

Die Inseln wurden unter Carbogenbegasung bei einer Schüttelfrequenz von etwa 60/min erneut 30 Minuten

bei 37° C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden sofort 1 ml Medium abpipettiert und bei -20° C für die Insulinbestimmung tiefgefroren. Die Inseln selbst wurden sofort in 2,5 %iger, gepufferter Glutaraldehydlösung oder nach Ito und Karnovsky (35) fixiert (2,5% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd, 0,05 % Pikrinsäure, 0,1 m Cacodylatpuffer, pH 7,3).

Insgesamt wurden drei verschiedene Bradykininkonzentrationen, nämlich 2, 20 und 200 ng/ml, in Abhängigkeit von drei verschiedenen Glukosekonzentrationen getestet. Aus jeweils 10 Inkubationen (à 20 Inseln/ 4 ml Medium) wurde der Mittelwert der Insulinkonzentration/ml Medium errechnet (entsprechend der Insulinsekretion von 5 Inseln/ml Medium/ 30 min). Die Sekretionsleistung pro Insel und Minute wurde ebenfalls errechnet.

2.1.3. Insulinbestimmung ¹

Die Insulinbestimmung erfolgte mit Hilfe eines radioimmuno-assay, bei dem Ratteninsulin als Standard diente. Die Eichkurve wurde aus "triplet counts" erstellt und erfaßt einen Bereich zwischen 0 und 200 $\mu\text{E}/\text{ml}$. Die Insulinwerte der Proben wurden jeweils doppelt bestimmt. Die Proben mußten z.T., insbesondere für die Inkubationen mit hohen Glukosekonzentrationen bis zu fünffach verdünnt werden (67)

2.1.4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Nach der 30- bis 60-minütigen Fixierung der isolierten Inseln wurde das Gewebe in nach Sørensen gepufferter Saccharoselösung aufbewahrt. Die Einbettung erfolgte manuell in Epon. Ultradünnschnitte wurden mit einem Reichert-Ultramikrotom angefertigt und mit Uranylacetat kontrastiert und in einem Siemens-Elmiskop II mikroskopiert.

¹ Die Insulinbestimmungen wurden von Endokrinologischen Labor der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen durchgeführt.

2.2. Ergebnisse

2.2.1. Insulinsekretion isolierter Inseln

2.2.1.1. Inkubation mit 2 ng Bradykinin/ml

Für die 10 Inkubationsserien wurden die Inseln aus dem Pankreas von 6 Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 260 g verwendet. In Tabelle 20 sind die Insulinsekretionsraten für eine 30-minütige Inkubation von 5 Inseln/ml Medium protokolliert. Bei einer Glukosekonzentration von 0,5 g/l scheint die Insulinsekretion in Anwesenheit von 2 ng/ml Bradykinin etwas im Vergleich zu den Kontrollen gehemmt zu sein, und zwar um etwa 30 Prozent, während bei einer Glukosekonzentration von 2 und 3 g/l mit Bradykinin die Insulinsekretion gegenüber den Kontrollen nicht unterschiedlich ist (vgl. Tab. 20). Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

Tab. 20:

Insulinsekretionsraten für 30 Minuten Inkubation von 5 Inseln/ml Medium und 2 ng BK/ml (in μ E/ml)

	G ₁ (n=9)	G ₂ (n=10)	G ₃ (n=10)	K ₄ (n=10)	K ₅ (n=10)	K ₆ (n=10)
	332	390	315	164	335	548
	265	393	333	267	275	565
	642	557	488	163	390	345
	195	182	637	275	400	648
	105	278	205	116	140	220
	67	151	201	55	117	182
	149	400	298	102	400	229
	65	173	322	103	231	126
	183	182	286	57	194	231
		279	201	108	82	136
M	202	299	329	141	256	323
s	$\pm$ 131	$\pm$ 129	$\pm$ 142	$\pm$ 77	$\pm$ 122	$\pm$ 192
IRI/ Insel/ min.	1,35	1,99	2,19	0,94	1,71	2,15
s	$\pm$ 0,87	$\pm$ 0,89	$\pm$ 0,92	$\pm$ 0,51	$\pm$ 0,81	$\pm$ 1,29

G₁: Gey-Puffer mit 0,5 g/l Glukose

G₂: Gey-Puffer mit 20 g/l Glukose

G₃: Gey-Puffer mit 3,0 g/l Glukose

K₄: G₁ mit 2 ng Bradykinin

K₅: G₂ mit 2 ng Bradykinin

K₆: G₃ mit 2 ng Bradykinin

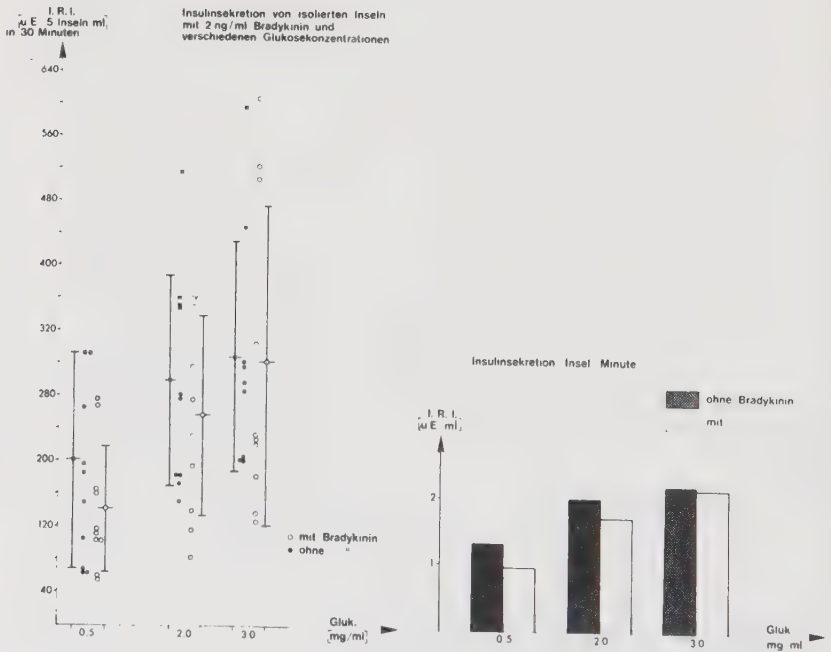


Abb. 18:

Insulinsekretion von isolierten Inseln mit 2 ng Bradykinin und verschiedenen Glukosekonzentrationen

2.2.1.2. Inkubationen mit 20 ng/ml Bradykinin

Für die Inkubation von Langerhans'schen Inseln mit 20 ng Bradykinin/ml Medium bei verschiedenen Glukosekonzentrationen wurde das Pankreas von 10 Ratten verwendet, von denen zwei 400 g, die übrigen 180 bis 200 g Körpergewicht hatten. In Tabelle 21 sind die Einzelwerte der Insulinsekretionsraten für diese Inkubationen zusammengestellt. In dieser Inkubationsserie stimmten die Insulinwerte der Kontrollinkubationen G_1 , G_2 und G_3 am besten mit den in der Literatur angegebenen Werten überein. Bei einer Glukosekonzentration von 0,5 g/l (G_1) wurden 0,79 μ E Insulin/Insel/min sezerniert, bei einer Glukosekonzentration von 2,0 g/l (G_2) 1,44 μ E/Insel/min und bei einer Glukosekonzentration von 3,0 g/l (G_3) 2,34 μ E/Insel/min. In Anwesenheit von 20 ng/ml Bradykinin kommt es im Gegensatz zur 2 ng-Konzentration zu einer geringfügigen Steigerung der Insulinsekretion (K_4 und K_5). Bei einer Glukosekonzentration von 3,0 g/l mit 20 ng/ml Bradykinin dagegen zu einer geringfügigen Hemmung (K_6). Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

In Abbildung 19 sind die Einzel- und Mittelwerte der Insulinsekretion von 5 Inseln/ml in 30 Minuten, sowie die Sekretionsleistung mit und ohne Bradykinin dargestellt.

Tab. 21:

Insulinsekretionsraten für 30 Minuten Inkubation von 5 Inseln/ml Medium und 20 ng Bradykinin/ml (in μ E/ml)

	G ₁ (n=11)	G ₂ (n=11)	G ₃ (n=10)	K ₄ (n=9)	K ₅ (n=12)	K ₆ (n=9)
	98	231	390	144	270	219
	200	228	284	98	228	274
	76	161	272	115	306	376
	203	122	416	147	152	296
	117	210	256	279	302	368
	72	93	380	162	255	470
	110	198	302	181	256	262
	179	194	338	193	233	288
	294	400	344	190	295	400
	182	194	530		318	
	70	350			270	
					208	
M _± s	145 _± 71	216 _± 89	351 _± 82	168 _± 53	258 _± 48	328 _± 79
IRI/Insel/Min	0,97	1,44	2,34	1,12	1,72	2,19

G₁: Gey-Puffer mit 0,5 g/l Glukose

G₂: Gey-Puffer mit 2,0 g/l Glukose

G₃: Gey-Puffer mit 3,0 g/l Glukose

K₄: G₁ mit 20 ng/ml Bradykinin

K₅: G₂ mit 20 ng/ml Bradykinin

K₆: G₃ mit 20 ng/ml Bradykinin

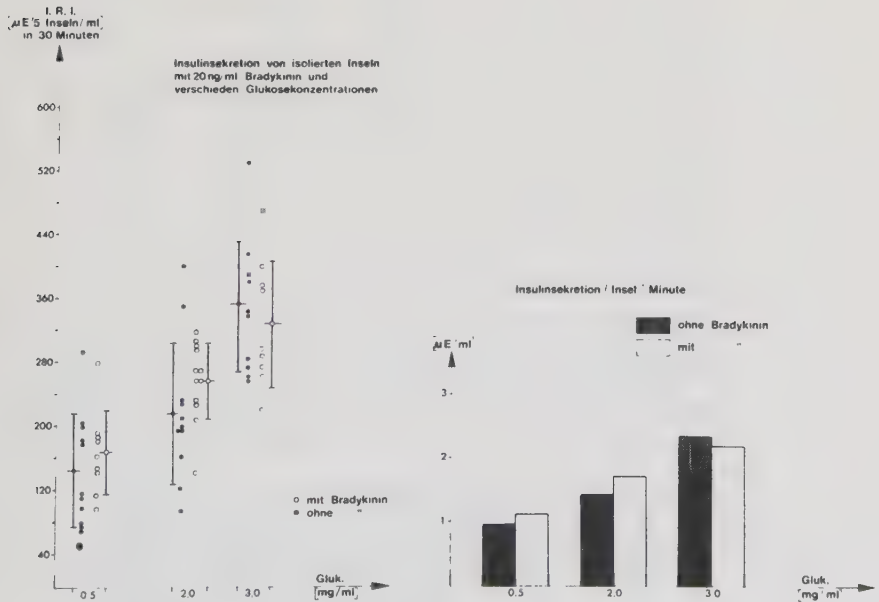


Abb. 19:

Insulinsekretion von isolierten Inseln mit 20 ng Bradykinin
und verschiedenen Glukosekonzentrationen

2.2.1.3. Inkubationen mit 200 ng Bradykinin/ml

In dieser Serie wurde das Pankreas von 8 Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 135 und 287 g verwendet. Die Sekretionsraten für die Glukosekontrollen mit 2,0 und 3,0 g/l ergaben für die niedrigere Glukosekonzentration (G_2) eine höhere Sekretion (2,08 μ E) von Insulin. Als Kontrollen wurden daher die Sekretionsraten von der 20 ng-Bradykininserie verwendet. Die mittlere Sekretionsrate für K_4 bei 200 ng/ml Bradykinin betrug $192 \pm 110 \mu$ E Insulin/ 5 Inseln/ml Medium/30 min, für K_5 223 ± 97 und für K_6 $313 \pm 102 \mu$ E. Vergleicht man die Sekretion mit den Kontrollen aus der 20 ng-Serie, kommt es bei einer Glukosekonzentration von 0,5 g/l und 200 ng Bradykinin (K_4) zu einer Steigerung der Insulinsekretion (etwa um 24%), bei einer Glukosekonzentration von 2,0 g/l mit 200 ng Bradykinin (K_5) bleibt die Sekretion unbeeinflusst und bei einer Glukosekonzentration von 3,0 g/l mit Bradykinin (K_6) kommt es zu einer leichten Hemmung der Insulinsekretion. Auch diese Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (s. Tab. 22). In Abbildung 20 sind die Insulinsekretionsraten für die Inkubationen mit 200 ng/ml Bradykinin und die Insulinsekretionsleistung/ Insel und Minute dargestellt.

Tab. 22:

Insulinsekretionsraten für 30 Minuten Inkubation von 5 Inseln/ml Medium und 200 ng Bradykinin/ml (in $\mu\text{E/ml}$)

	G ₁ (n=10)	G ₂ (n=7)	G ₃ (n=9)	K ₄ (n=10)	K ₅ (n=11)	K ₆ (n=11)
	375		278	266	368	419
	225	274	462	69	282	282
	62	390	218	75	207	231
	24	380	444	288	365	315
	21	360	208	266	140	250
	266	287	197	360	83	275
	141	300	78	267	321	533
	169	196	255	70	124	381
	115		250	92	91	160
	520			163	256	335
					217	258
M $\pm$ s	192 $\pm$ 160	312 $\pm$ 62	266 $\pm$ 120	192 $\pm$ 110	223 $\pm$ 97	313 $\pm$ 102
IRI/Insel/Min.	1,28	2,08	1,77	1,28	1,49	2,09

G₁: Gey-Puffer mit 0,5 g/l Glukose

G₂: Gey-Puffer mit 2,0 g/l Glukose

G₃: Gey-Puffer mit 3,0 g/l Glukose

K₄: G₁ mit 200 ng/ml Bradykinin

K₅: G₂ mit 200 ng/ml Bradykinin

K₆: G₃ mit 200 ng/ml Bradykinin

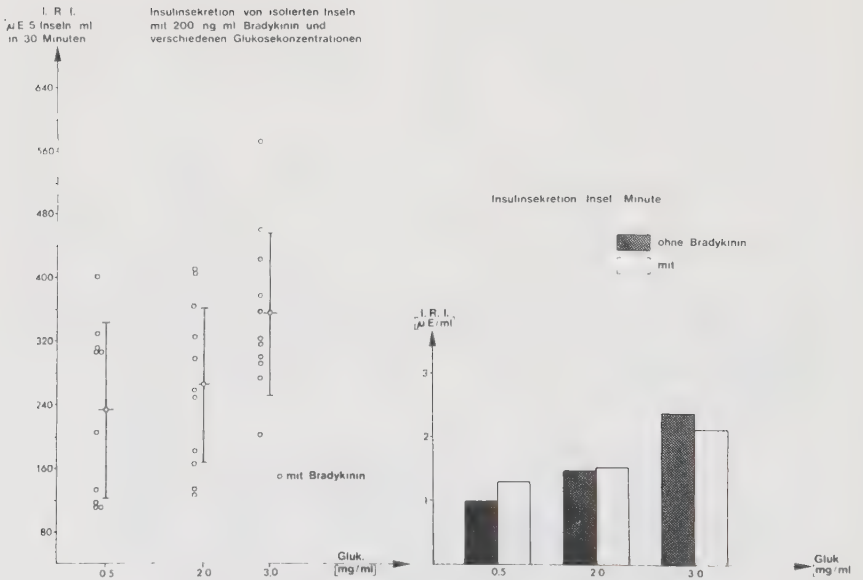


Abb. 20:

Insulinsekretion von isolierten Inseln mit 200 ng Bradykinin und verschiedenen Glukosekonzentrationen

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse aus den Inkubationsversuchen zusammengefaßt: Für eine hohe Glukosekonzentration von 3,0 g/l ergibt sich für die Insulinsekretion unter 2, 20 und 200 ng Bradykinin/ml jedesmal eine geringe Hemmung gegenüber alleiniger Glukosestimulation. Bei einer Glukosekonzentration von 2,0 g/l führt Bradykinin in 2 und 20 ng/ml Konzentration zu einer Steigerung der Insulinsekretion, während es bei einer Konzentration von 200 ng/ml keinen Einfluß auf die Sekretion ausübt. Bei sehr niedrigen, nicht stimulierenden Glukosekonzentrationen von 0,5 g/l (G_1) hemmt Bradykinin bei 2 ng/ml geringfügig die Insulinsekretion, bei 20 ng/ml hat es einen leicht steigernenden und bei 200 ng/ml einen deutlich fördernden Effekt auf die Insulinsekretion. Diese Effekte wurden nicht statistisch gesichert.

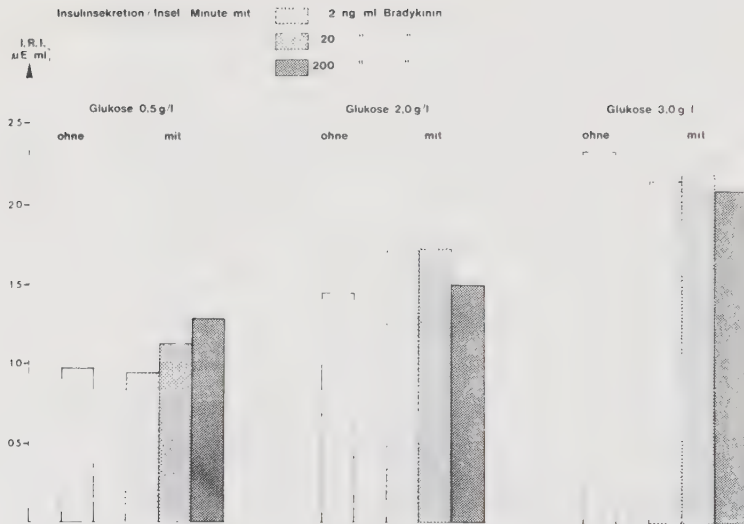


Abb. 21:

Zusammenfassung über die Insulinsekretion von isolierten
Langerhans'schen Inseln

2.2.2. Feinstruktur der isolierten Langerhans'schen Inseln

Die Langerhans'schen Inseln aus allen Versuchsgruppen wurden elektronenmikroskopisch untersucht.

2.2.2.1. In Voruntersuchungen wurde gesichert, daß unter den beschriebenen Isolierungsbedingungen die Kollagenaseverdauung bis zu 12 Minuten keine Schädigung der Ultrastruktur der Inseln bewirkt.

Abbildung 22a und b zeigt bei 4000-facher Vergrößerung die Peripherie einer vollständig isolierten, jedoch nicht inkubierten Insel. Die Oberfläche ist frei von exokrinem Gewebe und wird im wesentlichen durch A-Zellen gebildet (Abb. 22a), während die B-Zellen mehr im Zentrum gelegen sind. Die B-Zellen (Abb. 22b) zeigen die typischen Granula mit elektronendichtem, exzentrischem Kern (core) innerhalb einer mit einer einfachen Membran umhüllten Vakuole. Die Zellkerne sind regelrecht strukturiert, die Mitochondrien vom Crista-Typ und die Golgi-Komplexe nicht geschwollen. Die Interzellularspalten erscheinen stellenweise erweitert, und in diese Erweiterungen ragen mikrovillusartige Fortsätze hinein. Ähnliche zytoplasmatische Ausläufer finden sich auch an der freien Oberfläche der Insel. Die Kapillaren sind, sofern sie nicht Erythrozyten enthalten, kollabiert und weisen in ihrem Endothel ebenfalls Mikrovilli auf.

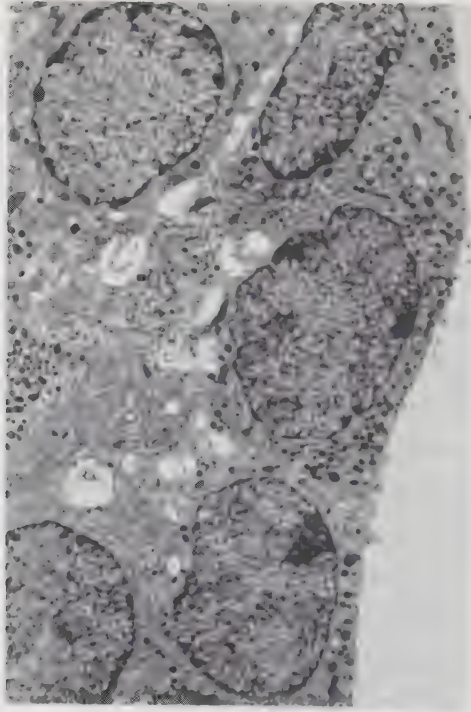


Abb. 22 a:

Peripherie einer Langerhans'schen Insel nach Isolierung.
Oberflächlich gelegene A-Zellen, keine anhaftenden exo-
krinen Pankreasdrüsenzellen

Orig. Vergr. 4000-fach (Montage)

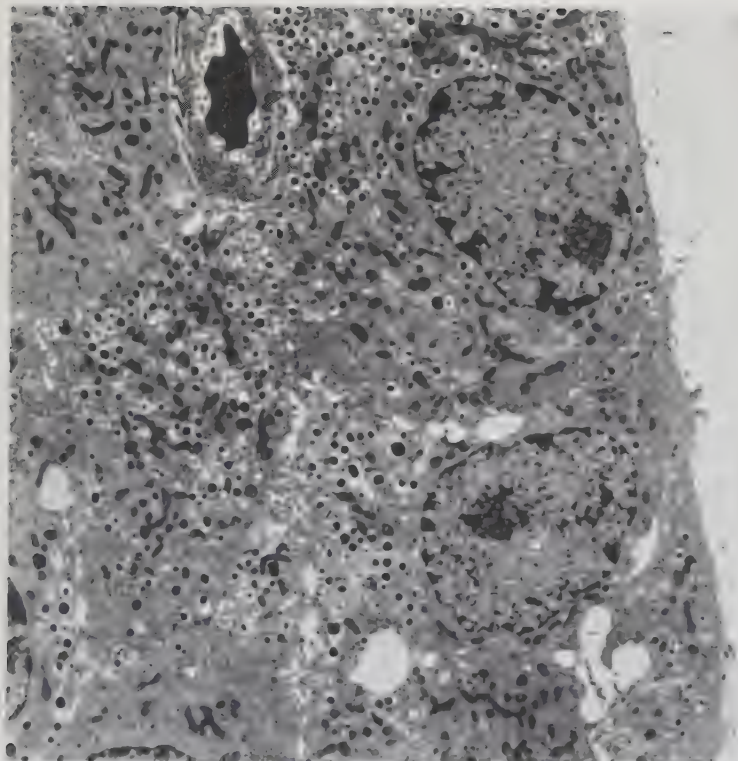


Abb. 22 b:

Ausschnitt aus der gleichen Langerhans'schen Insel
wie Abb. 22 a

B-Zellen mit typischen Granula, erweiterte Inter-
zellulärspalten mit Mikrovilli

Orig. Vergr. 4000-fach (Montage)

2.2.2.2. Morphologische Befunde nach der Inkubation

Auch nach der Vorinkubation und Inkubation bleibt die Ultrastruktur der Langerhans'schen Inseln intakt.

Vergleicht man die Feinstruktur der mit Bradykinin inkubierten Inseln mit den Kontrollen ohne Bradykinin, aber entsprechender Glukosekonzentration, so ergeben sich morphologisch keine klaren Unterschiede.

Die Abbildung 23 zeigt eine B-Zelle aus einer Kontrollinsel (G_1 : nach 30 minütiger Inkubation in Gey-Medium mit 0,5 g/l Glukose) nach Inkubation mit nicht stimulierender Glukosekonzentration, in der sowohl reichlich typische B-Granula zur Kapillare hin orientiert vorkommen, wie auch ein sehr gut entwickelter Golgi-Komplex zu erkennen ist.

Die mit Bradykinin inkubierten Inseln zeigen dagegen in einzelnen B-Zellen eine Änderung der Granulierung nach Dichte und Struktur. Wie Abbildung 24 zeigt, enthält die angeschnittene B-Zelle insgesamt weniger typische, reife Granula und einen relativ höheren Anteil von Granula, deren Kern noch weniger elektronendicht erscheint und einen größeren Teil der Vakuole ausfüllt. Die Abbildung 24 stammt

von einer Insel, die 30 Minuten in Medium mit 20 ng/ml Bradykinin und einer Glukosekonzentration von 0,5 g/l (K_4) inkubiert wurde.

Auch sind hier und da Stellen zu beobachten, wo die oberflächlich gelegenen Mikrovilli aufgetrieben und plump erscheinen, wie es aus Abbildung 25 ersichtlich wird.

Eindeutige Emiozytosefiguren wurden ausgesprochen selten beobachtet. Bei Inseln, die mit stark stimulierenden Glukosekonzentrationen, also G_3 (3,0 g/l) und K_6 (3,0 g/l mit Bradykinin) inkubiert wurden, erkennt man häufig eine Ausrichtung der Granula zur Zelloberfläche hin und Formänderungen der Granulakerne (kristalloides Aussehen, rhombisch) oder auch manchmal "leere" Granula (Abb. 26). Besonders deutlich treten in Abbildung 26 die mikrotubulären und mikrofilamentösen Elemente in Erscheinung.

Insgesamt, also auch für die Inkubationen mit anderen Bradykininkonzentrationen, die hier nicht abgebildet sind, treten morphologisch nur geringe Unterschiede auf, so daß auf eine morphometrische Auswertung der Befunde verzichtet wurde.

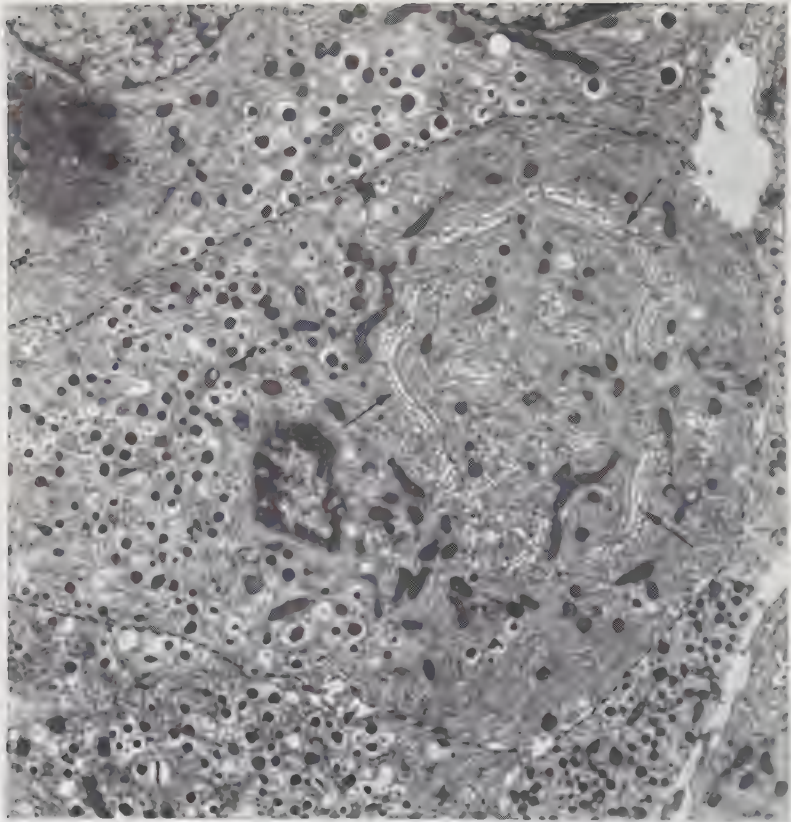


Abb. 23:

B-Zelle einer isolierten Langerhans'schen Insel nach
30 min. Inkubation mit 0,5 g/l Glukose (G_1)

Gut entwickelter Golgi-Apparat (↔), reichlich
typische Granula

Orig. Vergr. 6000-fach (Montage)

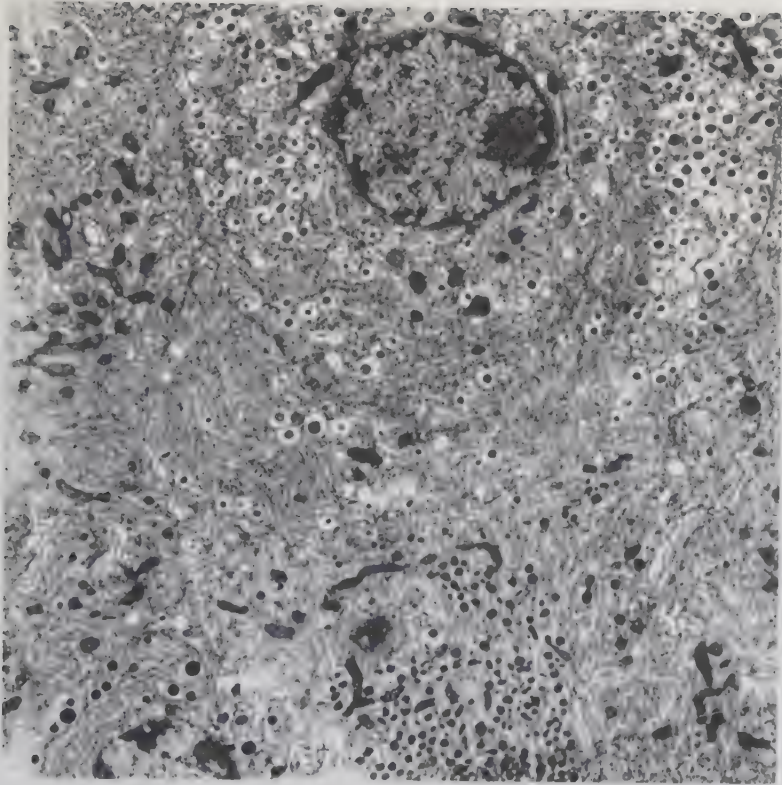


Abb. 24:

Ausschnitt aus einer isolierten Langerhans'schen Insel
nach 30 min. Inkubation mit 20 ng/ml Bradykinin und 0,5 g/l
Glukose (K_4)

Granulierung der B-Zellen heterogen, typische Granula
neben z. T. "unreifen" (weniger elektronendichter Kern),
z. T. verschmelzend.

Orig. Vergr. 6000-fach (Montage)

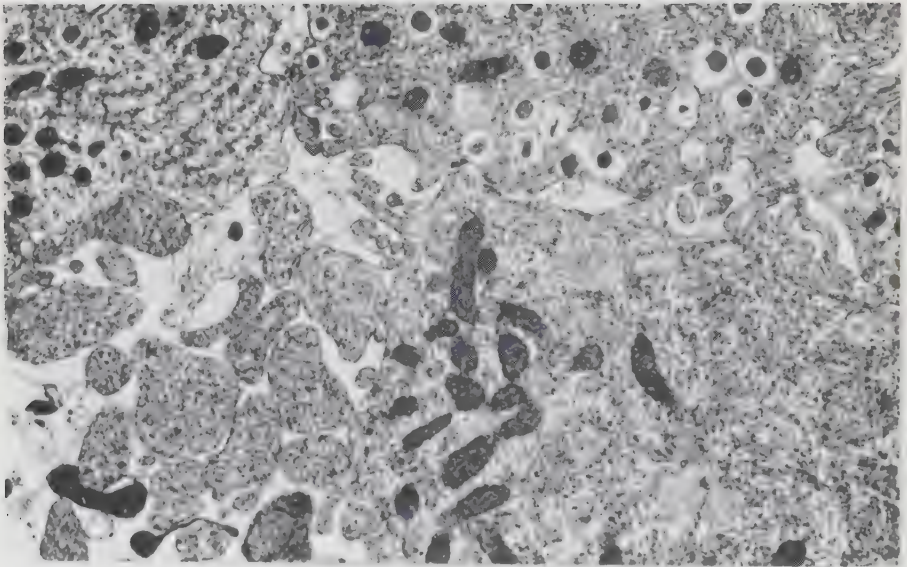


Abb. 25:

Ausschnitt aus der gleichen Langerhans'schen Insel
wie Abb. 24 (K_4)

Plumpe Mikrovilli in den Interzellularspalten

Orig. Vergr. 6000-fach

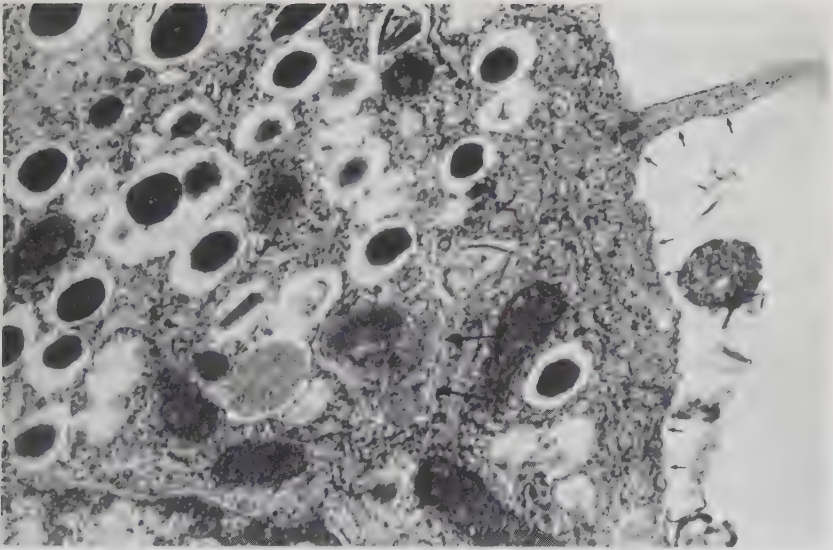


Abb. 26:

Ausschnitt aus einer B-Zelle nach 30 min. Inkubation
mit 3,0 g/l Glukose (G_3)

Ausrichtung der Granula zur Zelloberfläche hin,
Mikrotubulus ($\longleftrightarrow$) und Mikrofilamente ($\rightarrow$)

Orig. Vergr. 20000-fach

2.5. Diskussion

Bei der von uns verwendeten Methodik der Isolierung von Langerhans'schen Inseln in vitro ergaben sich Inselpräparate von einem hohen Reinheitsgrad, was sich sowohl lichtmikroskopisch (Abb. 17) als auch elektronenmikroskopisch (Abb. 22) zeigen ließ. Es kann somit ausgeschlossen werden, daß die erhaltenen Ergebnisse durch Verunreinigung mit exokrinem Gewebe oder durch Andauung einzelner endokriner Zellen verfälscht worden sind.

Aus Inkubationsversuchen mit Langerhans'schen Inseln läßt sich natürlich nicht, wie etwa bei Perifusionsversuchen mit isolierten Inseln (40) oder bei Perfusionen des isolierten Pankreas (25, 59), eine Aussage über den zeitlichen Ablauf der Insulinsekretion gewinnen. Über den zeitlichen Ablauf und die zellulären Mechanismen bei der Insulinsekretion liegen heute zahlreiche, eingehende Befunde vor. Im allgemeinen gilt als gesichert, daß die Insulinsekretion unter dem Einfluß konstanter, stimulierender Glukosekonzentrationen in 2 Phasen verläuft (26). Etwa eine Minute nach Stimulationsbeginn beginnt die Sekretion, die in den folgenden 2 bis 3 Minuten ein Maximum erreicht und rasch wieder abklingt. Diese erste Sekretionsphase, die sich über einen Zeitraum von 5 Minuten erstreckt, setzt jedoch nur etwa 2 bis 3 % des gesamten Insulinvorrates einer Insel frei. Das initial freigesetzte Insulin ist - so wird heute allgemein angenommen - kein neu synthetisiertes Hormon, sondern ein präformiertes, in einem eigenen, zellulären Kompartiment bereitliegendes Insulin.

Die 2. Sekretionsphase schließt sich unmittelbar der initialen an und zeichnet sich durch einen protrahierten Anstieg der Hormonsekretion, der nach etwa 45 bis 60 Minuten verlangsamt wird, und durch insgesamt niedrigere Maximalwerte aus. Die 2. Sekretionsphase wird von B-Zellen wahrscheinlich aus einem 2. Kompartiment bestritten (Theorie des 2-Kompartiment-Modells der Insulinsekretion), das nach den Vorstellungen der Morphologen in der mehr im Zellinneren lokalisierten B-Granulapopulation zu suchen ist.

Mit Rücksicht auf diese Sekretionskinetik haben wir einen Zeitraum von 30 Minuten für die Bradykinininkubation gewählt. Dieser Zeitraum erfaßt nicht nur die initiale Sekretionsphase, sondern auch den Beginn der Hauptphase, die nach den meisten bisher vorliegenden Befunden nach 90 Minuten einen konstanten Spiegel erreicht (52).

Da nicht erwartet werden kann, daß die isolierten Inseln noch Kininogene in ausreichender Menge enthalten, wurde auch nicht mit Kallikrein, sondern mit einem seiner Endprodukte der natürlichen Reaktionskette, nämlich mit Bradykinin, gearbeitet.

Wie die Ergebnisse zeigten, ließ sich durch Bradykininzusatz in Dosen von 2, 20 oder 200 ng/ml an den isolierten Langerhans'schen Inseln keine nennenswerte Änderung der Insulinsekretion erzielen. Die in den Kontrollversuchen erhaltenen Insulinwerte stimmen gut mit denen der Literatur überein (43). Die große Streuweite der ermittelten Insulinsekretionsraten ist methodisch bedingt und hängt u.a. auch mit der absoluten

Größe der jeweiligen Inselgruppen zusammen. Bei den geringen Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrollwerten erschien eine statistische Bearbeitung des Zellmaterials nicht erforderlich.

Daß das Modell funktionierte, zeigte sich jedoch an den eindeutigen Steigerungsraten der Insulinsekretion, die durch höhere Glukosekonzentrationen im Medium zu erreichen waren. Ähnliche Werte hat auch Worliceck (67) mit einer Perfusionstechnik erhalten.

Insgesamt läßt sich somit feststellen, daß Bradykinin im in-vitro-Modell die Insulinsekretion nicht verändert.

Dafür sprechen auch die elektronenmikroskopischen Befunde, obwohl eine Zunahme der Degranulation von B-Zellen nur bei ganz massiven Stimulationseffekten quantitativ überhaupt nachweisbar ist.

So wurden z. B. selbst nach einstündiger Glukosestimulation maximal nur etwa 20 % des gestapelten Insulins von den B-Zellen abgegeben (52). Auch die unterschiedliche Verteilung der B-Granula in den Zellen erschwert die morphometrische Auswertung und damit den Nachweis signifikanter Veränderungen.

In unseren Präparaten waren zwar überall Zellabschnitte mit Degranulationszeichen zu erkennen, aber die Unterschiede waren nicht groß genug, um eindeutige Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrollmaterial beweisen zu können. Auch Emiozytosefiguren waren selbst unter hoher Glukosestimulation zu selten, als daß sie für eine quantitative Auswertung hätten verwendet werden können.

Abschließend läßt sich somit feststellen, daß die im ersten Teil geschilderten Kallikreineffekte nicht auf indirektem Wege über eine Stimulation der Insulinsekretion zustande kommen. Es muß vielmehr im lebenden Organismus durch Kallikrein eine Kette von Reaktionen ausgelöst werden, die letztlich die Utilisation der Glukose in der Peripherie auf direktem Wege zu beeinflussen in der Lage sind.

3. Zusammenfassung

In Anknüpfung an Untersuchungen von Rohen und Haberland, sowie Dietze und Wicklmayr, wonach das Kallikrein-Kinin-System auch für den Glukosestoffwechsel des Organismus eine Rolle spielen soll, wurden im ersten Teil der Arbeit In-vivo-Versuche an subtotal pankreatektomierten Ratten mit Kallikrein und im zweiten Teil In-vitro-Versuche an isolierten Langerhansschen Inseln mit Bradykinin durchgeführt.

Im ersten Teil der Arbeit werden eine Reihe verschiedener Versuchsserien an diabetischen oder prädiabetischen Ratten nach Pankreatektomie beschrieben, bei denen Kallikrein in physiologischen Dosen entweder 1 oder 2 Stunden vor einem Glukosetoleranztest i.p. appliziert worden war. Es zeigte sich, daß die K-Werte bei den mit Kallikrein behandelten Tieren signifikant höher lagen als bei den Kontrollen, was auf eine durch die Enzymwirkung verbesserte Glukoseutilisation der Körperzellen schließen läßt. Nach länger dauerndem Diabetes (1 - 1 1/2 Jahre nach der Pankreatektomie) war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Auch nach oraler Applikation von Kallikrein ergaben sich erhöhte K-Werte, jedoch waren die Effekte bei dieser Versuchsanordnung nicht so ausgeprägt wie nach i.p. Gaben, was mit den erschwerten Versuchsbedingungen in Zusammenhang gebracht wird.

In einer weiteren Versuchsserie wurde die Wirkung von

Kallikrein an streptozotizindiabetischen Ratten geprüft. Auch bei diesen Versuchen zeigte sich eine deutliche Tendenz zu einer Steigerung der K-Werte durch Kallikrein. Da in den Streptozotizin-Versuchen die B-Zellen der Langerhansschen Inseln mit Sicherheit zerstört sind, kann der bei den pankreatektomierten Tieren beobachtete Kallikrein-Effekt nicht indirekt durch eine Insulin-freisetzung aus dem Restpankreasgewebe zustande gekommen sein.

Um jedoch exakter zu prüfen, ob die verbesserte Glukoseutilisation unter Kallikrein unabhängig von der Insulinsekretion ist, wurden im zweiten Teil der Arbeit In-vitro-Versuche mit isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte durchgeführt. Die Isolierung der Inseln erfolgte mit Hilfe der von Moskalewski eingeführten Methode der Kollagenaseverdauung, Sedimentation und stufenweisen Abpipettierung unter mikroskopischer Kontrolle. Den isolierten Inseln wurde Glukose und Bradykinin in 3 verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und die jeweilige Insulinsekretion nach 30 Minuten Inkubationszeit bestimmt. In allen 3 Versuchsserien ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Insulinsekretion und zwar weder nach Zusatz von 2 ng/ml, 20 ng/ml noch 200 ng/ml Bradykinin. Die Insulinfreisetzung steigt parallel mit den steigenden Glukosekonzentrationen. Zwischen den Bradykinin-be-

handelten Präparaten und den Kontrollen gleicher Glukosekonzentration ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten außerdem, daß die Ultrastruktur der Inseln auch nach der Kollagenaseverdauung noch weitgehend erhalten ist und daß nach Bradykinin-Behandlung keine morphologischen Anzeichen einer gesteigerten Sekretionsleistung der B-Zellen zu erkennen war, obwohl in einzelnen B-Zellen Anzeichen einer partiellen Degranulierung durchaus zu beobachten sind.

Insgesamt weisen also die beschriebenen verschiedenen Versuche dieser Arbeit daraufhin, daß Kallikrein einen unmittelbaren Effekt auf die Glukoseutilisation der zuckerverarbeitenden Zellen haben muß und daß dieser Effekt nicht auf indirektem Wege vermittelt einer Stimulation des B-Zellensystems zustande kommt.

Literaturverzeichnis

1. Burr, J.M.; Sharp, R.: Effects of prostaglandin E_1 and of epinephrine on the dynamics of insulin release in vitro. *Endocrinology* 94/3 (1974) 835-839.
2. Butterfield, W.J.M.; Holling, H.E.: Peripheral glucose metabolism in fasting control subjects and diabetic patients. *Clin. Sci.* 18 (1959) 147.
3. Caspary, W.F.; Creutzfeldt, W.: The influence of kallikrein on absorption of sugars and aminoacids in rat small intestine in vitro. In: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.: Kininogenases 1, S. 67-74, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
4. Conrad, v. et al.: Physiological interpretations of glucose-tolerance-tests. In: Handbuch des Diabetes mellitus, Bd. II, E.F. Pfeiffer, Lehmann-Verlag (1971).
5. Dennhardt, R.; Haberich, F.J.: Effect of kallikrein on absorption of water, electrolytes and hexoses in the intestine of rats. In: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.: Kininogenases 1, S. 81-88, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
6. Dietl, T.; Kruck, J.; Fritz, H.: Localization of kallikrein in porcine pancreas and submandibular gland as revealed by the indirect immunofluorescence technique. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359 (1978) 499-505.
7. Dietl, T.; Schack, L.: Die Wirkung von Schweinepankreas-kallikrein auf den mittleren Blutdruck der Ratte. (In Vorbereitung)
8. Dietze, G.: München-Vortrag. *Acta Endocrinol.* 79.

9. Dietze, G.; Wicklmayr, M.; Mayer, L.: Evidence for a participation of the kallikrein-kinin-system in the regulation of muscle metabolism during hypoxia.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358 (1977) 633-638.
10. Dietze, G.; Wicklmayr, M.; Mayer, L.; Böttger, J.; v. Funke, H.: Bradykinin and human forearm metabolism: Inhibition of endogenous prostaglandin synthesis.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359 (1978) 369-378.
11. Erdős, E.: The angiotensin I-converting enzyme.
Fed. Proc. 36 (1977) 1760-1765.
12. Fasciolo, J.C.; Halvorsen, K.: Specificity of mammalian kallidinogen.
Am. J. Physiol. 207 (1964) 901.
13. Fiedler, F.: Enzymology of glandular kallikreins. In: Erdős, E.G.: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 25, Suppl., S. 103, Springer-Verlag, Berlin (1979).
14. Fink, E.; Geiger, R.; Witte, J.; Biedermann, S.; Fritz, H.: Biochemical, pharmacological and functional aspects of glandular kallikreins. In: Enzymatic release of vasoactive peptides, VIII: Workshop Conference Hoechst, Schloß Hainsheim 1979.
15. Foglia, V.G.: Característica de la diabetes en la rata.
Rev. Argent. Biol. 20 (1944) 21-34.
16. Foglia, V.G.: Experimental Prediabetes.
IDF VII (1970) 198 - 208
17. Frey, E.K.; Kraut, H.; Werle, E.: Über die blutzuckersenkende Wirkung des Kallikreins.
Klin. Wochenschr. 11 (1932) 1-9.

18. Frey, E.K.; Kraut, H.; Werle, E.: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.
Enke-Verlag, Stuttgart (1968).
19. Frey, E.K.; Kraut, H.; Werle, E.: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren - Präkallikreine und Kallikreine, S. 18-20.
Enke-Verlag, Stuttgart (1968).
20. Friedman, N.B.; Marble, A.: Island hyperplasia in the partially depancreatized rat.
Endocrinology 29 (1941) 577-582.
21. Fritz, H.: The kallikrein-kinin-system in reproduction-biochemical aspects. In: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.; Schirren, C.; Huber, P.: *Kininogenases* 2, S. 9-16,
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1975).
22. Gerner, R.; L'Age-Stehr, J.; Tjioe, T.O.; Wacker, A.: Zur Isolierung Langerhans'scher Inseln aus Rattenpankreas.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 309-312.
23. McGiff, J.C.; Itskovitz, H.D.; Terragno, A.; Wong, P.G.K.: Modulation and mediation of the action of the renal kallikrein-kinin-system by prostaglandins.
Fed. Proc. 35 (1976) 175-180.
24. Geberna, R.; Fußgänger, R.D.; Raptis, S.; Ditschneit, H.; Pfeiffer, E.F.: Glybenclamid (HB 419) and the prediabetes of subtotally pancreatectomized rats.
Horm. Metab. Res. 1 (1969) 175-177.
25. Grodsky, G.M.; Bennett, L.; Batts, A.; McWilliams, N.; Vcella, C.: Insulin secretion from isolated perfused pancreas.
Fed. Proc. 21 (1962) 202.

26. Grodsky, G.M.; Landahl, H.; Curry, D.; Bennett, L.:
In-vitro-studies suggesting a two-compartmental model
for insulin secretion. In: Falkmer, S.; Hellman, B.;
Taljedal, I.B.: Structure and metabolism of the pan-
creatic islets, Pergamon Press, Oxford (1970), S. 409-
420.
27. Haas-Denk, S.; Lohninger, A.; Erhardt, W.; Blümel, G.:
The effect of kallikrein on the pattern of fatty acids
of phospholipids and triglycerides in plasma and organs
of rats. In: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.; Suzuki, T.:
Kininogenases 4, S. 197-202, Schattauer-Verlag, Stuttgart
(1977).
28. Haberland, G.L.: The role of kininogenases, kinin formation
and kininogenase inhibition in posttraumatic shock and
related conditions.
Klin. Wochenschr. 56 (1978) 325-331.
29. Haberland, G.L.; Rohen, J.W.: Kininogenases - Kallikrein.
1st Symposium on physiological properties and pharmaco-
logical rationale, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
30. Haberland, G.L.; Rohen, J.W.; Schirren, C.; Huber, P.:
Kininogenases - Kallikrein 2. Physiological properties
and pharmacological rationale reproduction, Schattauer-
Verlag, Stuttgart (1975).
31. Haberland, G.L.; Rohen, J.W.; Blümel, G.; Huber, P.:
Kininogenases - Kallikrein 3. Physiological properties
and pharmacological rationale proliferation, reparation
and function, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1975).
32. Haberland, G.L.; Rohen, J.W.; Suzuki, T.: Kininogenases -
Kallikrein 4. Physiological properties and pharmacological
rationale, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1977).

33. Hebel, R.; Stromberg, M.W.: Anatomy of the laboratory rat. Williams & Wilkins (1976).
34. Igić, R.; Erdős, E.G.; Yeh, H.S.J.; Sorrells, K.; Nakajima, T.: The angiotensin I-converting enzyme of the lung. *Circ. Res.* 31 (1972) II-51 - II-61.
35. Ito, S.; Karnovsky, J.: Formaldehyde-glutaraldehyde fixation containing trinitro compounds. *J. Cell Biol.* 39 (1968) 168a- 169a.
36. Jacobsen, S.: Substrates for plasma kinin-forming enzymes in rat and guinea-pig plasma. *Brit. J. Pharmacol.* 28 (1966) 64.
37. Junod, A.; Lambert, A.; Renold, A.F.: The diabetogenic action of streptozotocin. 6. Congr. Intern. Diabetes Fed. (Stockholm 1967); Intern. Congr. Series No. 140, Abstr. 261, Excerpta Med. Found. Amsterdam (1967).
38. Keen, H.; Sells, R.; Jarrett, R.J.: A method for the study of the metabolism of isolated mammalian islets of Langerhans and some preliminary results. *Diabetologia* 1 (1965) 28-32.
39. Lacy, P.E.; Kostianovsky, M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from rat pancreas. *Diabetes* 16 (1967) 35-39.
40. Lacy, P.E.; Walker, M.M.; Fink, C.J.: Perifusion of isolated rat islets in vitro: Participation of microtubular system in biphasic insulin release. *Diabetes* 21 (1972) 987-998.

41. Lee, J.C.; Grodsky, G.M.; Bennett, L.L.; Smith-Kyle, D.F.; Craw, L.: Ultrastructure of beta-cells during the dynamic response to glucose and tolbutamide in vitro. *Diabetologia* 6 (1970) 542-549.
42. Löbbecke, E.A.: Effect of kallikrein on the proliferation of various cell systems. In: Haberland, G.L.; Rohen, J. W.: *Kininogenases I*, S. 161-170, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
43. Malaisse, W.J.: Hormonal and environmental modification of islet activity. - Unpublished data. In: *Handbook of Physiology*, section 7: Endocrinology, Vol. 1, Endocrine pancreas. *Am. Physiol. Soc.* (1972), S. 238.
44. Martin, J.M.; Lacy, P.E.: The prediabetic period in partially pancreatectomized rats. *Diabetes* 12 (1963) 238-242.
45. Meng, K.; Haberland, G.L.: Influence of kallikrein on glucose transport in the isolated rat intestine. In: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.: *Kininogenases I*, S. 75-80, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
46. Morgan, H.E.; Randle, P.J.; Regen, D.: Regulation of glucose uptake by muscle: 2. The effects of insulin, anoxia, salicylate and 2,4 dinitrophenol on membrane transport and intracellular phosphorylation of glucose in the isolated rat heart. *Biochem. J.* 73 (1959) 573.
47. Moskalewski, S.: Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea-pig. *Gen. Comp. Endocr.* 5 (1965) 342-352.

48. Ole-Moiyoi, C.; Pinkus, G.S.; Spragg, J.; Austen, K.F.:
Identification of human glandular kallikrein in the beta-cell of the pancreas.
New Engl. J. Med. 300/23, 1284-1289. (1979)
49. Palm, S.; Fritz, H.: Components of the kallikrein-kinin-system in human midcycle cervical mucus and seminal plasma.
In: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.; Schirren, C.; Huber, P.: Kininogenases - Kallikrein, Vol. 2, S. 17-21, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1975).
50. Proud, D.; Bailey, G.S.; Ørstavik, T.B.: The location of prekallikrein in the rat pancreas.
Biochem. Soc. Trans. 5 (1977) 1402-1404.
51. Rabes, H.M.: Proliferation kinetics of hepatocytes in regenerating rat liver after kallikrein injection. In: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.; Suzuki, T.: Kininogenases 4, S. 127-136, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1977).
52. Randle, P.J.; Hales, C.N.: Insulin release mechanisms.
In: Handbook of Physiology, section 7: Endocrinology, Vol. 1: Endocrine pancreas.
Am. Physiol. Soc. 1972, 219-232.
53. Rohen, J.W.; Haberland, G.L.: Wirkungen des Kallikrein-Kinin-Systems bei pankreatektomierten Ratten.
Med. Welt 28 (1977) 30-32.
54. Rohen, J.W.; Möschler, U.M.; Goebel, F.D.; Dennhardt, R.: The effect of kallikrein on the intestinal lymph-system in rats. - Physiological and morphological studies. In: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.: Kininogenases 1, S. 95-112, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).

55. Rudas, B.: Streptozotozin.
Arzneimittelforsch. (Drug Res.) 22 (1972) 830-861.
56. Sachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden.
7. Aufl., Springer-Verlag, Berlin (1972).
57. Scow, R.O.: "Total" pancreatectomy in the rat: Operation,
effects and postoperative care.
Endocrin. 60 (1957) 359.
58. Sealey, J.E.: Activation of inactive renin by renal kallikrein. VIII. Workshop Conference Hoechst: Enzymatic release of vasoactive peptides, Schloß Heinsheim (1979).
59. Sussman, K.E.; Vaughan, G.D.; Timmer, R.F.: An in-vitro-method for studying insulin secretion in the perfused isolated rat pancreas.
Metabolism 15/5 (1966) 466-476.
60. Tauber, A.; Petrowicz, O.; Erhardt, W.; Musselmann, R.; Blümel, G.: Experimental study in rats on the influence of kallikrein on the testicular blood flow. In: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.; Suzuki, T.: Kininogenases 4, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1977).
61. Torrill, B.; Ørstavik, T.B.; Nustad, K.; Gautvik, K.M.: Localization and secretion of glandular kallikrein in exocrine organs of the rat.
International Symposium on Kinin, Tokyo, Nov. 6.-9. (1978).
62. Vance, J.E.; Bragg, S.C.: Insulin release in response to microvasoactive substances.
Diabetes 18 (1969) 326-327.
63. Webster, M.E.: Kallikreins in glandular tissues. In: Erdös, E.G.: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 25: Bradykinin, Kallidin und Kallikrein, S. 131-155, Springer-Verlag, Berlin (1970).

64. Werle, E.: History of kallikrein and some aspects of its chemistry and physiology. In: Haberland, G.L.; Rohen, J.W.: Kininogenases 1, S. 7-23, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1973).
65. Wicklmayr, M.; Dietze, G.; Günther, B.; Mayer, L.; Böttger, I.; Geiger, R.; Schultis, K.: Verbesserung der gestörten Glukoseverwertung durch Bradykinin bei Diabetikern und bei Patienten in postoperativem Streß.
Klin. Wochenschr. 56 (1978) 1077-1083.
66. Wicklmayr, M.; Dietze, G.; Mayer, L.; Böttger, I.; Grunst, J.: Evidence for an involvement of kinin liberation in the priming action of insulin on glucose uptake into skeletal muscle.
FEBS Letters 98/1 (1979) 61-65.
67. Worliček, H.: Harnsäure und Insulinsekretion.
Inauguraldissertation des Fachbereichs Medizin der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (1979).
68. Yang, H.Y.T.; Erdös, E.G.; Levin, Y.: Characterization of a dipeptide hydrolyse (kininase II: angiotensin I-converting enzyme).
J. Pharmacol. Exp. Ther. 177 (1971) 291-300.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. J.W. Rohen für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Grabner und dem endokrinologischen Labor der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen für die Insulinbestimmungen, Herrn Dr. R. Geyger vom Institut für Klinische Chemie, München, für die Kininogenbestimmungen, dem Zentrallabor der Universität Erlangen für die Blutzuckerbestimmungen und den Mitarbeitern des Anatomischen Instituts, insbesondere Fräulein W. Zimmermann für die Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche.

Lebenslauf

Name: Lieselotte Schack

Geburtsdatum: 8. 5. 1949

Geburtsort: Offenbach am Main

Eltern: Dipl. Ing. Karl Schack
Oberbaurat
Marie Schack, geb. Osterheld

Schulbildung: 1955 - 59 Freiliggrath-Schule
in Frankfurt
1959 - 67 Herderschule, Gymnasium
für Mädchen, Frankfurt

Studium: 1968 - 70 an der Philipps-Univer-
sität Marburg in der
Medizinischen Fakultät
1970 - 73 an der Julius-Maximi-
lians-Universität,
Würzburg

Berufliche Tätigkeit: 1974 Medizinalassistent am
Rehabilitationszentrum
Lippoldsberg unter Leitung
von Prof. Dr. v. Olders-
hausen (Innere)
am Kreiskrankenhaus Eber-
mannstadt unter Leitung von
Dr. Scheller (Chirurgie)
1975 - 76 Assistenzärztin am
Stadtkrankenhaus Hemer
unter Leitung von Dr. Abs-
hagen
Seit dem 1. 9. 1976 wissenschaft-
liche Assistentin am Anatomischen
Institut der Universität Er-
langen-Nürnberg

Lieselotte Schack

